

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTA DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

E. A. P. DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

**“Elucidación estructural del polisacárido del alga
roja *Porphyra columbina* y determinación *in vivo*
de la capacidad antioxidante e hipolipemiente”**

TESIS

Para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutico

AUTOR

Blanca Yessenia Aguilar Velasquez

ASESOR

César Máximo Fuertes Ruitón

Lima – Perú

2015

Dedicatoria

Cuando te propongas un objetivo has que este sea beneficioso para tanta gente como puedas, da salud. Jamás te quiebres, siempre levántate, sueña, imagina, alcanza, concretiza. Si te dicen que no podrás es porque ellos ya se rindieron, camina. Son tus pies andando en la tierra y es toda la diferencia que necesitas.

Descubrir es mostrar lo que no se podía ver, crear es un salto más allá. El creador debe estar preparado para su creación o sólo habrá dado paso a la aberración.

*A todas las invaluables
personas en mi vida que
día a día me demuestran
sus sinceros sentimientos
de estima haciéndome
crecer más y más en todos
los sentidos que mi
humilde humanidad
permite.*

Agradecimientos

A mi familia, por siempre mostrarme que la unión es más fuerte que todas las adversidades, y yo tengo en ellos los más fuertes hombros.

A mi padre Genaro, por estar ahí para mí, acordarse de los pequeños detalles y mostrarme que ser exigente con uno mismo y anhelar lo mejor de la forma correcta te hará una persona invaluable.

A mi madre Blanca Aurora, por mostrarme a las mujeres luchadoras, de esfuerzo infinito, de sacrificios grandes, de amor incalculable y por apoyarme siempre en mi educación.

A mis hermanos, Ricardo y Jeyson, por ser mis confidentes en nuevos retos, el descanso en las noches en la sala de la casa y su amistad verdadera, como tienen y tendrán la mía.

A mi asesor el profesor César Fuertes, por su confianza, su espera y su ayuda incondicional en el laboratorio de Química Orgánica, quien me demostró durante toda mi época universitaria con su ejemplo que el brindar las herramientas para que los alumnos sean mejores, el ejercer su defensa y también establecer parámetros ha de ser siempre motivo de lucha y motivo de regocijo aun cuando los nombres de los hacedores de tales logros sea olvido de muchos. Gracias.

Al departamento de Bioquímica de mi tan querida Facultad, por su soporte estructural y valioso conocimiento aportado en la realización de esta tesis. Especialmente a la profesora Elizabeth Carranza quien es una gran investigadora y da paso al pensamiento libre de los estudiantes para luego apoyarte a concretizar tus objetivos.

Al Servicio Académico Asistencial de Análisis Clínicos, cuyo personal se esfuerza día a día por mostrar a la sociedad la contribución de los Químicos Farmacéuticos en su salud, por las instalaciones y equipos brindados para la realización de las pruebas de perfil lipídico.

A la profesora Marina Marín, por sus valiosos consejos en la realización de las pruebas toxicológicas.

A mis amigas Guísela y Kate, compañeras de aulas y personas invaluableles en mi vida que me dan la perseverancia para terminar esta grandiosa experiencia, y a grandes amigos que he tenido la dicha de encontrar en el camino quienes desinteresadamente y con el ímpetu de adquirir nuevos conocimientos me apoyaron en los ensayos realizados: Leo, Edén, Winy, Katy, Maggie.

A los amables señores de la biblioteca y de mantenimiento de la Facultad que nos cobija a todos, por su sentido de cooperación con el estudiante y futuro profesional. Mi profundo y sincero aprecio.

Al profesor Mario Benavente, por sus largas historias sobre los intentos de industrializar las algas en el Perú y por su ayuda en la selección de la especie algal estudiada.

Al Vicerrectorado de Investigación de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, por su labor constante en el apoyo a la realización de tesis de pregrado las cuales se convierte en carta de presentación a la sociedad del sincero deseo de ser un profesional a su servicio y a su vez obtener el título por el que será llamado y reconocido.

Al jurado calificador de esta tesis de pregrado: al profesor Pablo Bonilla por su sentido de una educación gratuita para todos, a la profesora Gloria Gordillo por sus esfuerzo en la mejora estructural de la Facultad y su ayuda al estudiante de pregrado, a la profesora Bertha Jurado por sus horas de entrega a la investigación en el laboratorio, a la profesora Eva Ramos por su energía para nuevos retos y promoción de la investigación. Sus invaluable consejos y observaciones terminan de dar forma a esta corta obra, larga experiencia y primer manifiesto de mis deseos serios por el descubrimiento de nuevas cosas en muchos aspectos profesionales y personales donde la naturaleza siempre tendrá un gran espacio.

A Dios, por sobre todas las cosas, por todas las cosas. Por lo que ha sido, por lo que es y lo que será.

Un paso de Fe, muchas razones. Gracias.

ABREVIATURAS

Bp	Par de base
P.	<i>Porphyra</i>
FT-IR	Infrarrojo con transformada de Fourier
RMN	Resonancia magnética nuclear
SOD	Superóxido dismutasa
CAT	Catalasa
INS	Instituto Nacional de Salud
ROs	Especies reactivas del oxígeno
RSS	Especies reactivas del azufre
RNS	Especies reactivas del nitrógeno
GPx	Glutación peroxidasa
GSH	Glutación reducido
GSSG	Glutación oxidado
MDA	Malondialdehído
PUFA	Ácido graso poliinsaturado
GRd	Glutación reductasa
RO [•]	Radical alcóxil
ROO	Radical peróxil
ROOH	Hidroperóxido
LOOH	Hidroperóxido lipídico
OONO	Anión peroxinitrito
C	Colesterol
TG	Triacilglicerol
Acetil-CoA	Acetilcoenzima A
HDL	Lipoproteína de alta densidad
LDL	Lipoproteína de baja densidad

VLDL	Lipoproteína de muy baja densidad
HPL	Hiperlipemias
AG	Ácidos grasos
MG	Monoacilglicerol
DG	Diacilglicerol
PDGF	Factor de crecimiento derivado de las plaquetas
3,6-AG	3,6-anhidrogalactosa
BPS	Tampón fosfato salino
c.s.p	Cantidad suficiente para
sol.	Solución
Abs	Absorbancia
OECD	Organización para la cooperación económica y desarrollo
TODR	Toxicidad oral dosis repetida
AST	Aspartato aminotransferasa
ALT	Alanina aminotransferasa
GNC	Grupo control normal en prueba antioxidante
GCM	Grupo control modelo de CCl ₄
GCV	Grupo control de vitamina C 25 mg/Kg de peso corporal
P625	Grupo inyectado con CCl ₄ y luego polisacárido 6.25 mg/Kg
P2500	Grupo inyectado con CCl ₄ y luego polisacárido 25 mg/Kg
P5000	Grupo inyectado con CCl ₄ y luego polisacárido 50 mg/Kg
GC	Grupo control normal en prueba hipolipemiante
GH	Grupo control de lipemia
GG	Grupo gemfibrozilo en prueba hipolipemiante
GP	Grupo polisacárido en prueba hipolipemiante
DL50	Dosis letal 50

TABLA DE CONTENIDO

Dedicatoria

Agradecimientos

Abreviaturas

Índice de Figuras

Índice de cuadros

Resumen

ABSTRACT

I. Introducción	1
------------------------	---

II. Generalidades	3
--------------------------	---

2.1 Algas Marinas Rodofitas	3
------------------------------------	---

2.1.1 El género <i>Porphyra</i>	5
---------------------------------	---

2.1.2 Breve estudio botánico del alga <i>Porphyra columbina</i>	6
---	---

2.1.2.1 Taxonomía	6
-------------------	---

2.1.2.2 Características físicas	6
---------------------------------	---

2.1.2.3 Ciclo de vida	7
-----------------------	---

2.1.2.4 Hábitat	9
-----------------	---

2.1.2.5 Distribución mundial	9
------------------------------	---

2.1.2.6 Distribución en el Perú	10
---------------------------------	----

2.1.3 Galactanos sulfatados	10
-----------------------------	----

2.1.3.1 Porfiranos	11
--------------------	----

2.1.3.1.1 Características estructurales	11
---	----

2.1.4 Actividad biológica de las algas marinas	14
--	----

2.1.4.1 Actividad biológica del porfirano	15
---	----

2.1.5 Usos y forma de consumo actual de <i>Porphyra</i>	16
---	----

2.1.6 Perspectivas futuras	17
----------------------------	----

2.2 Capacidad Antioxidante	18
-----------------------------------	----

2.2.1 Radicales libres	18
------------------------	----

2.2.1.1 Mecanismo de generación de radicales libres	18
---	----

2.2.1.2 Daños producidos por los ROSs	20
---------------------------------------	----

2.2.2 Peroxidación lipídica	21
-----------------------------	----

2.2.3 Mecanismos de defensa contra el daño oxidativo	23
--	----

2.2.3.1 Antioxidante	23
----------------------	----

2.2.3.1.1 Sistemas antioxidantes	23
----------------------------------	----

2.2.3.1.2 Antioxidantes enzimáticos	24
-------------------------------------	----

2.2.3.1.2.1 Superóxido dismutasa (EC 1.15.1.1)	24
--	----

2.2.3.1.2.2 Catalasa (EC 1.11.1.6)	24
------------------------------------	----

2.2.3.1.2.3 Glutatión peroxidasa (EC 1.11.1.9)	25
--	----

2.2.3.1.3 Antioxidantes no enzimáticos	26
--	----

2.2.3.1.3.1 Glutatión	26
-----------------------	----

2.2.3.1.3.2 Vitamina E	27
2.2.3.1.3.3 Vitamina C	27
2.2.3.1.3.4 Vitamina A.....	27
2.2.3.1.3.5 Coenzima Q10	28
2.2.4 Usos actuales, perspectivas futuras	28
2.3 Capacidad Hipolipemiante	30
2.3.1 Metabolismo de los lípidos	30
2.3.1.1 Colesterol	30
2.3.1.1.1 Vía del mevalonato	32
2.3.1.2 Triacilgliceroles	34
2.3.1.3 Lipoproteínas	36
2.3.1.3.1 Quilomicrones	37
2.3.1.3.2 Lipoproteína de muy baja densidad (VLDL)	37
2.3.1.3.3 Lipoproteína de densidad media (IDL)	37
2.3.1.3.4 Lipoproteína de baja densidad (LDL)	38
2.3.1.3.5 Lipoproteína de alta densidad (HDL)	38
2.3.1.4 Valores normales de lípidos plasmáticos	40
2.3.2 Dislipidemias	40
2.3.2.1 Tipos de dislipidemias.....	41
2.3.2.1.1 Hiperlipemias	41
2.3.3 Enfermedades relacionadas.....	42
2.3.3.1 Aterosclerosis	42
2.3.3.2 Obesidad.....	42
2.3.4 Tratamiento	43
2.3.4.1 Tratamiento farmacológico.....	43
2.3.4.1.2 Fármacos hipolipemiantes	43
2.3.4.1.2.1 Inhibidores de la hidroximetilglutaril coenzima A reductasa (HMG-CoA-Reductasa): estatinas	43
2.3.4.1.2.2 Resinas de intercambio iónico.....	44
2.3.4.1.2.3 Fibratos o derivados del ácido fenoxiisobutírico	44
2.3.4.1.2.4 Ácido nicotínico	44
2.3.5 Tratamiento no farmacológico	45
2.3.5.1 Dieta.....	45
2.3.6 Perspectivas futuras del tratamiento hiperlipídico	45
III. Parte Experimental.....	46
3.1 Material, equipos y reactivos	46
3.1.1 Material botánico	46
3.1.2 Materiales biológicos.....	46
3.1.3 Materiales de vidrio y otros	46

3.1.4 Equipos	47
3.1.5 Reactivos	47
3.2 Recolección y selección del alga	48
3.3 Obtención del polisacárido del alga	48
3.3.1 Determinación de humedad	48
3.3.2 Extracción y purificación del polisacárido.....	49
3.3.3 Liofilización.....	50
3.3.4 Análisis de unidad monomérica y grupo sulfato.....	53
3.3.4.1 Análisis cuantitativo de 3,6-anhidrogalactosa	53
3.3.4.2 Análisis cuantitativo de sulfato.....	54
3.3.5 Análisis por espectroscopia infrarroja (IR)	55
3.3.6 Análisis por Resonancia Magnética Nuclear (RMN- ¹ H)	55
3.4 Estudio Farmacológico	56
3.4.1 Ensayo de toxicidad	56
3.4.1.1 Ensayo de toxicidad aguda oral	56
3.4.1.2 Ensayo de toxicidad oral dosis repetida	58
3.4.2 Capacidad antioxidante <i>in vivo</i>	60
3.4.2.1 Cálculo del Índice de hígado.....	62
3.4.2.2 Medición de transaminasas (aspartato aminotransferasa y alanina aminotransferasa) en suero.....	62
3.4.2.3 Medición de los productos de la peroxidación lipídica	65
3.4.2.3.1 Medición de superóxido dismutasa (SOD)	65
3.4.2.3.2 Medición de la actividad de la catalasa (CAT).....	67
3.4.2.3.3 Medición de la glutatión peroxidasa (GPx)	68
3.4.2.3.4 Medición de malondialdehído (MDA)	69
3.4.2.4 Determinación de proteínas	71
3.4.3 Capacidad hipolipemiante.....	72
3.4.3.1 Preparación de las sustancias a emplear en el tratamiento	72
3.4.3.2 Tratamiento	73
3.4.3.3 Evaluación Bioquímica.....	74
3.4.3.3.1 Determinación de colesterol (C)	74
3.4.3.3.2 Determinación de triacilgliceroles (TG).....	76
3.4.3.3.3 Determinación de HDL.....	77
3.4.3.3.5 Determinación de VLDL	79
3.4.4 Análisis de datos	79
IV. Resultados	80
4.1 Obtención del polisacárido del alga.....	80

4.1.1	Determinación de humedad	80
4.1.2	Extracción, purificación y liofilización del polisacárido	80
4.1.3	Análisis de unidad monomérica y grupo sulfato	80
4.1.3.1	Análisis cuantitativo de 3,6-anhidrogalactosa	80
4.1.3.2	Análisis cuantitativo de sulfato	80
4.1.4	Análisis por espectroscopia infrarroja (IR)	81
4.1.5	Análisis por Resonancia Magnética Nuclear (RMN- ¹ H)	84
4.2	Estudio Farmacológico	86
4.2.1	Ensayo de Toxicidad	86
4.2.1.1	Ensayo de toxicidad aguda oral	86
4.2.1.2	Ensayo de toxicidad oral dosis repetida (TODR)	87
4.2.2	Capacidad antioxidante <i>in vivo</i>	88
4.2.2.1	Cálculo del Índice de hígado	88
4.2.2.2	Medición de transaminasas en suero	88
4.2.2.2.1	Medición de AST (aspartato aminotransferasa)	88
4.2.2.2.2	Medición de ALT (alanina aminotransferasa)	89
4.2.2.3	Medición de los productos de la peroxidación lipídica	91
4.2.2.3.1	Medición de superóxido dismutasa (SOD)	91
4.2.2.3.2	Medición de la actividad de catalasa (CAT)	93
4.2.2.3.3	Medición de la glutatión peroxidasa (GPx)	93
4.2.2.3.4	Medición de malondialdehído (MDA)	94
4.2.2.3.5	Determinación de proteínas	95
4.2.2.3.6	Observaciones microscópicas de tejido hepático	96
4.2.3	Capacidad hipolipemiente	98
4.2.3.1	Pesos de los conejos	98
4.2.3.2	Determinación de colesterol (C)	99
4.2.3.3	Determinación de triacilgliceroles (TG)	99
4.2.3.4	Determinación de HDL	100
4.2.3.5	Determinación de LDL	100
4.2.3.6	Determinación de VLDL	101
V.	Discusión	102
VI.	Conclusiones	113
VII.	Recomendaciones	114
VIII.	Referencias Bibliográficas	115
	Anexo	127
	Glosario	134

Índice de Figuras

Figura N° 1. Forma macroscópica de <i>Porphyra columbina</i> Montagne ²¹	7
Figura N° 2. Ciclo de vida de <i>Porphyra columbina</i> ²⁴	8
Figura N° 3. Dímero metilado derivado de la hidrólisis del porfirano metilado ²⁸	12
Figura N° 4. Estructuras de porfiranos comparados con los polisacáridos del grupo agar ²⁴	14
Figura N° 5. Generación de ROSs ⁶⁰	19
Figura N° 6. Patogénesis del tejido dañado ⁶³	20
Figura N° 7. Objetivos de los ROSs ⁶⁰	21
Figura N° 8. Proceso de la peroxidación lipídica ⁶⁶	22
Figura N° 9. Estructuras de 4-hidroxinonenal (A) y malondialdehído (B) ⁶⁸	23
Figura N° 10. Estructuras de ciclopentanoperhidrofenantreno y colesterol ¹⁰³ ...	31
Figura N° 11. Vía del mevalonato y la síntesis de isoprenoides ¹⁰⁹	33
Figura N° 12. Metabolismo de triacilglicerol en hígado ¹¹¹	35
Figura N° 13. Transporte de lípidos por vía exógena ⁹⁴	39
Figura N° 14. Diagrama de flujo de la extracción acuosa del porfirano de <i>Porphyra columbina</i>	51
Figura N° 15. Diagrama de flujo de la purificación, liofilización y análisis instrumental del porfirano	52
Figura N° 16. Esquema metodológico de tratamiento del hígado de ratón ¹⁶⁰ ...	62
Figura N° 17. Curva de calibración de sulfatos	81
Figura N° 18. Espectro Infrarrojo del porfirano (4000 cm ⁻¹ a 750 cm ⁻¹) de <i>Porphyra columbina</i>	82
Figura N° 19. Espectro infrarrojo del porfirano (1200 cm ⁻¹ a 800 cm ⁻¹) de <i>Porphyra columbina</i>	83
Figura N° 20. Espectro de RMN- ¹ H del polisacárido (porfirano) de <i>Porphyra columbina</i>	85
Figura N° 21. Comportamiento del peso de los ratones.....	86
Figura N° 22. Tejido hepático de ratón (dosis = 50 mg/kg)	87
Figura N° 23. Medias estimadas de Índice de hígado	88
Figura N° 24. Curva de calibración AST	89
Figura N° 25. Medias estimadas de AST	89

Figura N° 26. Curva de calibración ALT	90
Figura N° 27. Medias estimadas de ALT	90
Figura N° 28. Curva de calibración de SOD.....	92
Figura N° 29. Medias estimadas de SOD.....	93
Figura N° 30. Medias estimadas de CAT	93
Figura N° 31. Medias estimadas de GPx	94
Figura N° 32. Medias estimadas de MDA	94
Figura N° 33. Curva de calibración de proteínas.....	95
Figura N° 34. Observación microscópica de GCN	96
Figura N° 35. Observación microscópica de GCM.....	96
Figura N° 36. Observación microscópica de GCV	96
Figura N° 37. Observación microscópica de P6250.....	97
Figura N° 38. Observación microscópica de P2500.....	97
Figura N° 39. Observación microscópica de P5000.....	97
Figura N° 40. Medias de peso por día de tratamiento según grupo (conejo)	98
Figura N° 41. Medias por semana y grupo de tratamiento de C	99
Figura N° 42. Medias por semana y grupo de tratamiento de TG	99
Figura N° 43. Medias por semana y grupo de tratamiento de HDL.....	100
Figura N° 44. Medias marginales por semana y grupo de tratamiento de HDL100	
Figura N° 45. Medias por semana y grupo de tratamiento de VLDL	101
Figura N° 46. Separación del polisacárido	131
Figura N° 47. Polisacárido liofilizado	131
Figura N° 48. Ratones marcados. Toxicidad aguda oral	131
Figura N° 49. Coloración de Formazan rojo	132
Figura N° 50. Coloración rosada. Prueba de MDA.....	132
Figura N° 51. Administración de polisacárido por vía oral (conejo)	132
Figura N° 52. Vena marginal del conejo.....	133
Figura N° 53. Separación de suero en tubo vacutainer.....	133
Figura N° 54. Calibración de la prueba de colesterol.....	133

Índice de tablas

Tabla N° 1.	Antioxidantes enzimáticos⁸¹25
Tabla N° 2.	Ejemplo de enfermedades y posibles terapias antioxidantes⁹⁷29
Tabla N° 3.	Riesgo y normalidad de lípidos plasmáticos¹²⁵40
Tabla N° 4.	Pronóstico según valores de HDL¹²⁵40
Tabla N° 5.	Volúmenes de filtrado del extracto de <i>Porphyra columbina</i>.....	49
Tabla N° 6.	Medición de sulfato	54
Tabla N° 7.	Volúmenes de reactivos para curva de Calibración AST y ALT	63
Tabla N° 8.	Procedimiento de curva de Calibración para ALT y AST	64
Tabla N° 9.	Determinación de AST y ALT	64
Tabla N° 10.	Determinación de superóxido dismutasa (SOD).....	66
Tabla N° 11.	Determinación de catalasa (CAT).....	67
Tabla N° 12.	Determinación de glutatión peroxidasa (GPx)	69
Tabla N° 13.	Determinación de Malondialdehído (MDA)	70
Tabla N° 14.	Curva de calibración de proteínas	71
Tabla N° 15.	Tratamientos y extracción de sangre en conejos	74
Tabla N° 16.	Determinación de colesterol total en suero.....	75
Tabla N° 17.	Determinación de triacilgliceroles en suero	76
Tabla N° 18.	Determinación de HDL en suero.....	78
Tabla N° 19.	Curva de calibración de sulfatos.....	80
Tabla N° 20.	Medias de los pesos de ratones. Toxicidad aguda oral	86
Tabla N° 21.	Medias de los pesos de ratones para TODR.....	87
Tabla N° 22.	Curva de calibración de AST	88
Tabla N° 23.	Curva de calibración de ALT	90
Tabla N° 24.	Estadística descriptiva de los marcadores de daño hepático en ratones	91
Tabla N° 25.	Curva de Calibración de SOD	91
Tabla N° 26.	Valores medios de las enzimas antioxidantes y MDA	92
Tabla N° 27.	Curva de calibración de Proteínas.....	95
Tabla N° 28.	Medias de peso de conejos	98
Tabla N° 29.	Estadística descriptiva de la evolución de los marcadores lipídicos en conejos	101

RESUMEN

El objetivo principal de esta tesis es la elucidación estructural del polisacárido del alga roja marina *Porphyra columbina*, extraído en agua caliente, purificado y liofilizado, y el estudio de su actividad antioxidante en ratones e hipolipemiante en conejos. Previamente se evaluó la toxicidad aguda oral y toxicidad oral a dosis repetidas considerando que el material biológico sería expuesto a diferentes concentraciones del mismo. El análisis del espectro FT-IR y RMN-¹H muestra que el polisacárido de *P. columbina* tiene una típica estructura de porfirano: unidades β-D-galactosa, 4-O-α-L-galactosa-6-sulfato o 3,6-anhidro-α-L-galactosa. Los estudios de toxicidad para el caso de toxicidad aguda oral muestran ser no tóxico hasta concentraciones de 2000 mg/Kg, y para toxicidad oral dosis repetidas de 28 días a 50 mg/Kg evidencia daño hepático. Las pruebas *in vivo* en ratones midieron las actividades de las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GPx) así como los niveles medios de malondialdehído (MDA). Los resultados muestran incremento de las 3 enzimas evaluadas y disminución del MDA por administración intraperitoneal dosis-dependiente del polisacárido. El efecto hipolipemiante en conejos se determinó por evaluación del perfil lipídico: medición de C, TG, HDL y cálculo de LDL y VLDL. Los resultados mostraron disminución estadísticamente significativa, $p < 0.05$, tanto para los lípidos y lipoproteínas en evaluación en las condiciones del diseño experimental comparado con el grupo control de lipemia. El peso corporal de los conejos mostró diferencias significativas, $p < 0.05$, para los grupos en tratamiento.

Palabras clave: *Porphyra*, porfirano, peroxidación lipídica, antioxidante, hipolipemiante, lipoproteína.

ABSTRACT

The main aim of this thesis is the structural elucidation of polysaccharide from the red seaweed *Porphyra columbina*, hot water extracted, purified and lyophilized, and the study of its antioxidant activity in mice and the lipid-lowering effect in rabbits. Prior acute oral toxicity was evaluated considering the biological material would be exposed to different concentrations of the same. The IR and ¹H-NMR spectrum shows that the polysaccharide of *P. columbina* has a typical porphyran structure: β-D-galactose, 4-O-α-L-galactose-6-sulphate or 3,6-anhydro-α-L-galactose units. The toxicity study for the case of acute oral toxicity shown to be nontoxic up to 2000 mg/Kg strength, and for repeated dose 28-day oral toxicity study to 50 mg/kg liver damage is evident. *In vivo* tests in mice measured the activities of antioxidant enzymes superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), and glutathione peroxidase (GPx) as well as the mean levels of malondialdehyde (MDA). The results show increase of the 3 enzymes tested also decreased MDA by intraperitoneal administration dose-dependent polysaccharide. Hypolipidemic effect in rabbits was determined by the evaluation of the lipid profile: measurement of C, TG, HDL and LDL and VLDL was calculated. The results were statistically significant, $p < 0.05$, for both lipids and lipoproteins in assessment compared with control group of lipemia. Body weight of the rabbits showed significant differences, $p < 0.05$, for the groups in treatment.

Keywords: *Porphyra*, porphyran, lipid peroxidation, antioxidant, hypolipidemic, lipoprotein.

I. INTRODUCCIÓN

Hace pocos años comenzamos a revalorar los productos naturales a nivel mundial. La razón nace de querer cuidar la salud, corregir y prevenir enfermedades, con sustancias que no tengan o reporten mínimos efectos secundarios, más aún, con sustancias que puedan ser parte de la dieta de las personas. Entonces pensamos en fuentes de recursos de un país biodiverso como el Perú y podemos aspirar a encontrar recursos naturales que presenten en su composición distintas moléculas bioactivas que reporten diferentes beneficios para las personas que lo consumen, uno de estos recursos son las algas marinas rojas del género *Porphyra*. Las algas son ricas en fibra, proteínas, minerales, vitaminas, antioxidantes y ácidos grasos poliinsaturados, con bajo valor calórico¹ que les confieren propiedades antioxidantes, preventivas y terapéuticas contra enfermedades degenerativas, hipolipemiantes, anticoagulantes y anticancerígenas, entre otras^{1,2}.

Para poder brindar productos naturales y difundir conocimiento que la población requiere para su mejor uso, es preciso analizar sus componentes individuales y siendo los polisacáridos el principal componente de las algas rojas³, he ahí la razón de su estudio en el presente trabajo; la determinación por métodos químicos y espectroscópicos de sus características estructurales y su correlación con una estructura típica de porfirano, polisacárido principal en el género *Porphyra*, permitiría entender mejor sus características fisicoquímicas y tener una idea más cercana de su posible mecanismo de acción en el organismo humano⁴.

Dentro de las muchas propiedades que se le confieren a las algas marinas rojas, y especialmente a las *Porphyras*, es la antioxidante, que evita la oxidación de sustancias que puedan provocar alteraciones fisiológicas, de gran interés ya que se le ha relacionado a la prevención de múltiples enfermedades⁵. El uso de un diseño experimental *in vivo* con tetracloruro de carbono que genera daño hepático y alteración de enzimas así como aumenta la peroxidación lipídica, ampliamente usado para evaluar la capacidad

antioxidante de diversas sustancias y entre estas polisacáridos de algas marinas, resulta apropiado para tal fin⁶.

La capacidad hipolipemiente, es decir, la reducción de lípidos en sangre ayuda en el tratamiento de dislipidemias y obesidad, es de gran interés actual y futuro ya que se ha visto un mayor aumento de personas obesas en los últimos años, inclusive en poblaciones infantiles, teniendo como principal causa dietas hiperlipídicas⁷. Variados diseños experimentales que emplean la vía oral y cambios basados en la dieta hiperlipídica permiten establecer en el tiempo reducciones o aumentos de lípidos en suero a través de la evaluación del perfil lipídico y que para el caso de polisacáridos sulfatados de algas muestra reducción de lípidos en modelos animales estableciéndose su efecto hipolipemiente^{8,9}. Por lo cual se esperaría que *Porphyra columbina* presente capacidad hipolipemiente.

Aunque son muy escasos los estudios de toxicidad de algas, o de sus polisacáridos sulfatados, estudios llevados a cabo han reportado cierta toxicidad a determinadas concentraciones¹⁰. Por lo cual, es totalmente justificado y necesario realizar ensayos de toxicidad previo al uso de diferentes dosis en las pruebas *in vivo* que permitan elegir las dosis que nos brinden resultados fehacientes. La elección de los ensayos de toxicidad a realizar se basa en elegir aquellos que permitan soportar los estudios *in vivo* posteriores a realizarse siendo la toxicidad aguda oral y toxicidad oral dosis repetida en ratones los idóneos para el presente trabajo.

Por tales motivos se ha considerado relevante la elucidación estructural del polisacárido del alga *Porphyra columbina* y la determinación de sus capacidad antioxidante e hipolipemiente en un modelo *in vivo*.

II. GENERALIDADES

2.1 Algas Marinas Rodofitas

Las algas marinas pueden clasificarse en tres grandes grupos basados en su color: pardas, rojas y verdes denominando técnicamente a estos grupos feofíceas, rodofíceas y clorofíceas, respectivamente. Las algas marinas rojas suelen ser más pequeñas que las pardas, y por lo general su longitud varía de unos pocos centímetros a un metro; las algas marinas rojas no siempre presentan esta coloración: a veces son de color púrpura, e incluso de color rojo pardusco, pero a pesar de ello se clasifican como rodofíceas debido a otras características significativas en su clasificación taxonómica. Las algas marinas verdes son también pequeñas, y el margen de variación de sus dimensiones es similar al de las algas marinas rojas³. Las algas marinas reciben también el nombre de macroalgas¹, para distinguirlas de las microalgas, de tamaño microscópico, que suelen ser unicelulares y son conocidas sobre todo por las algas de color azul verdoso.

El filo Rhodophyta correspondiente a las denominadas algas rojas, comprende más de 6100 especies distintas de las cuales casi todas son algas marinas¹¹. Este filo es uno de los grupos más antiguos y abundantes entre los eucariotas, se cree que son descendientes directos de un cianoma en las Glaucophytas (asociación simbiótica entre un huésped y una cianobacteria intracelular), son un linaje distinto de eucariota cuyos miembros están unidos en los análisis filogenéticos de genes nucleares, de plastidios y mitocondriales, debido a la amplitud y diversidad estructural que presentan son sujeto de nuevos estudios para definir mejor los principales linajes abarcando mayor número de muestras en cada estudio¹² así mismo la caracterización, identificación o mutación de una especie se hace actualmente evaluando el DNA que contiene¹³.

Una explicación de su abundancia viene del hecho que se encuentren en todas las latitudes con marcada abundancia en regiones ecuatoriales aunque existiendo pocas especies en regiones polares y subpolares donde hay mayor presencia de algas pardas y verdes, su tamaño es mayor en áreas frías y

templadas que en tropicales donde principalmente son pequeñas plantas filamentosas (con excepción de las formas calcáreas), las algas rojas de agua dulce en general no alcanzan tamaños tan grandes como en agua salada. Sumado a lo anterior se adaptan mejor para vivir a grandes profundidades que los miembros de otros grupos, alcanzan hasta 200 m de profundidad, habilidad relacionada con los pigmentos accesorios a la fotosíntesis¹⁴.

Las algas rodofitas tienen las siguientes características químicas y celulares:

Características químicas^{14,15}

1. Pigmentos fotosintéticos: clorofilas *a* y *d* (las Bangiophyceae no presentan clorofila *d*).
2. Ficobiliproteínas: ficoeritrina, ficocianina, xantofilas y α , β -caroteno.
3. Mucílagos: ficocoloides como el agar y las carrageninas.

Características celulares^{14,15}

1. Ausencia de células flageladas.
2. Paredes con celulosa y cubiertas de mucílagos, a veces con deposiciones de carbonato cálcico.
3. Cloroplasto rodeado de dos membranas, tilacoides no agrupados con ficobilisomas.
4. Almidón de florídeas en el citoplasma.
5. Ausencia completa de centriolos en la división celular.
6. Células comunicadas por punteaduras.
7. Reproducción sexual por gametos inmóviles. Ciclos biológicos complejos con tres generaciones diferentes.

Estas características las llegan a diferenciar respecto de otros filos de algas y también plantear similitudes¹⁶ (Anexo I).

2.1.1 El género *Porphyra*

La división Rhodophyta presenta la clase Bangiophyceae y ahí encontramos el orden Bangiales, dentro de este a la familia Bangiaceae, y en esta al género *Porphyra*¹⁷. Hay 268 especies (e infraespecíficas), de los cuales 60 han sido señaladas como “actualmente aceptada taxonómicamente”¹¹.

Porphyra es una de las algas rojas más antiguas que se conoce, se encontraron fósiles que se asemejan cercanamente a este género que datan de cerca de 570 millones de años atrás en la formación rocosa de Doushantuo, caracterizado por ser uno de los yacimientos de fósiles más antiguos y mejor preservados, en el sur de China¹⁸. Las especies del género *Porphyra* son identificadas, todavía, por características como son la forma, color y grosor de las láminas, disposición de células reproductivas, tamaño y forma de células vegetativas, sin embargo, y como se señaló anteriormente, cada vez se hace más necesario el empleo de técnicas moleculares para caracterizar al género^{13,17}.

Debido a la gran importancia económica de las especies de *Porphyra* se tornó interesante establecer un organismo modelo para estudios básicos y aplicativos en la ciencia de las plantas, si a ello se suma que su genoma es pequeño (un máximo de 5 cromosomas, reportado) y con un tiempo de generación corto (1-3 meses) son ideales para análisis genético¹⁷. En el 2013 con el título “Complete mitochondrial genome of *Pyropia yezoensis*: reasserting the revision of genus” se anunciaba el término de la secuenciación del genoma mitocondrial de la también conocida *Porphyra yezoensis* o “Nori”, principal alga comercializada en China. El mitogenoma constaba de una sola molécula circular de 41 688 bp, la cual es la más larga secuencia de alga roja registrada, los resultados del análisis filogenético mostraron mayor cercanía a *Pyropia haitanensis* que a *Porphyra purpurea*¹⁹ corroborando la nueva clasificación que habían tenido las dos primeras, así como otras algas consideradas hasta entonces dentro del género *Porphyra*, en el año 2011 luego de un amplio estudio, se consideraron 157 especies de Bangiales, a través de los análisis combinados del gen rRNA SSU y el gen del plástido RUBISCO LSU (*rbcL*), se determinaron quince géneros de bangiales incluyendo el género *Pyropia*.

Porphyra está actualmente en constante estudio de sus especies para establecer su correcta clasificación taxonómica, incluyendo las de importancia económica, motivo de especial mención es el caso de *Porphyra yezoensis* y *Porphyra hateniensis* que ahora se clasifican como *Pyropia yezoensis* y *Pyropia hateniensis*²⁰. También ha habido cambios de especies de *Porphyra* a los nuevos géneros *Boreophyllum*, *Clymene*, *Fuscifolium*, *Lysithea*, *Miuraea*²⁰.

2.1.2 Breve estudio botánico del alga *Porphyra columbina*

2.1.2.1 Taxonomía

El alga *Porphyra columbina* tiene la siguiente clasificación sistemática, perteneciendo al reino plantae¹¹.

División: Rhodophyta

Subdivisión: Eurhodophytina

Clase: Bangiophyceae

Subclase: Bangiophycidae

Orden: Bangiales

Familia: Bangiaceae

Genero: *Porphyra*

Especie: *Porphyra columbina* Montagne

Nombre vulgar: “Cochayuyo”

2.1.2.2 Características físicas

Planta de talo laminar, agrupada o en roseta, lanceolada u oblonga lanceolada, de color marrón clara u oscura, o marrón violáceo iridiscente a marrón rojizo cuando están frescas mientras que secas el color se hace más intenso a negruzco. Alcanzan hasta 35 cm de longitud y 9 cm de ancho, la porción basal es generalmente cordada y está provista de un disco rizoidal coriáceo formado por células vegetativas provistas de filamentos rizoidales no coloreados; con margen entero, ondulado o crespado, contorneado notoriamente. Esta especie es extremadamente variable en hábitat, presenta formas umbilicadas, divididas

irregularmente o en roseta, constituidas por láminas lanceoladas si viven en lugares expuestas al oleaje. El espesor de la lámina también es variable, de delicados a otros más consistentes²¹.



Figura N° 1. Forma macroscópica de *Porphyra columbina* Montagne²¹.

2.1.2.3 Ciclo de vida

Presenta un ciclo de vida bifásico. La etapa o estadio que se conoce como “cochayuyo”, estadio macroscópico, comprende los talos de la especie. Sus semillas se conocen como conchosporas y son liberadas en la etapa conchocelis filamentosa, las cuales se encuentran adosadas a las conchas de moluscos o zonas rocosas durante el verano y el otoño²². Antes de 1949, se creía que la fase filamentosa era una especie distinta, *Conchocelis rosea*²³.

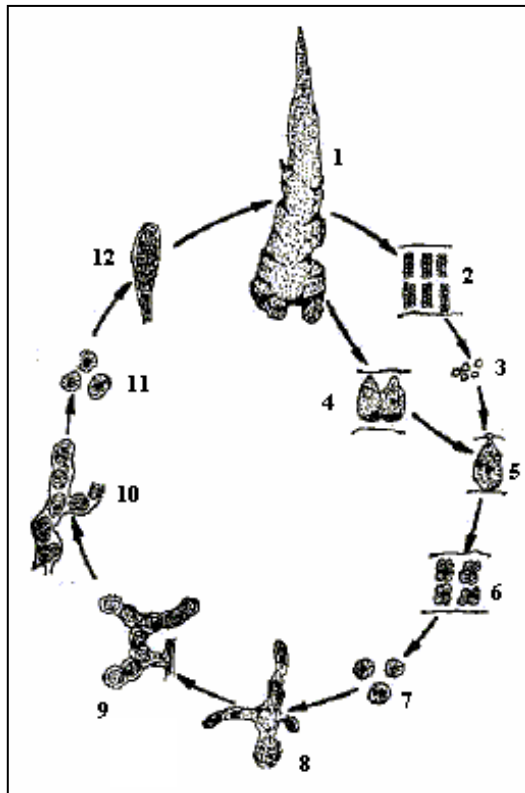


Figura N° 2. Ciclo de vida de *Porphyra columbina*²⁴: 1. talo; 2. espermagonio; 3. espermatida; 4. carpogonio; 5. huevo fertilizado; 6. carposporangio; 7. carpospora; 8. conchocelis filamentosa; 9. rama de esporangio de conchocelis; 10. Liberación de conchosporas; 11. conchospora; 12. talo joven.

En condiciones específicas de baja intensidad y calidad de luz, la duración del día y la temperatura estimulan la producción de gametos²⁴.

Los gametos macho, espermatida, se producen en paquetes, espermagonio, en los márgenes de las cuchillas y se liberan por disolución del margen. Los gametos femeninos, carpogonia, se forman a cierta distancia del margen^{22,23}. Una superficie receptiva ("tricógino") sobresale de cada carpogonio y a través de la matriz que la rodea y a la cual se adhiere la espermatida para efectuar la fertilización dando lugar al huevo fertilizado. El cigoto se divide para formar un paquete de células diploides (carposporangio). Las carposporas diploides se liberan del carposporangio por disolución del margen de la cuchilla. La germinación de las carposporas, para formar filamentos de conchocelis diploides,

no depende de la presencia de una base para fijarse como carbonato de calcio sólido aunque su sobrevivencia se ve mediada muchas veces por este factor²².

Los filamentos conchocelis se desarrollan y forman ramas hinchadas (conchosporangia) en las cuales las células desarrollan las características plástidas estrelladas con pirenoide notorio. Los filamentos conchocelis hinchados se fijan en el sustrato y eventualmente liberan su contenido como células individuales (conchosporas). Estas conchosporas comenzaran un nuevo ciclo de vida²³. Las condiciones óptimas, tales como temperatura, salinidad y baja intensidad de luz, para el crecimiento de talos de *Porphyra*, varían. En general, los talos jóvenes pueden resistir temperaturas más altas que los adultos²³ (Figura N° 2).

2.1.2.4 Hábitat

Vive preferentemente sobre sustrato rocoso, expuesta en la zona de las mareas, formando asociaciones con *Ulva fasciata* forma costata y *Enteromorpha intestitnalis*. Ocasionalmente viven epífitas sobre *Gymnogongrus furcellatus*, *Ahnfeltia durvillcrei* y *Prionitis decipiens*. En la costa central (Ancón, Barranco, Pucusana) comparte el mismos hábitat con *Porphyra pseudolanceolata*. Frecuentemente en los meses de setiembre a enero²¹.

2.1.2.5 Distribución mundial

A nivel mundial *Porphyra columbina* se encuentra en los mares de los siguientes países²¹:

1. Sur América: Argentina, Chile, Perú.
2. Australia y Nueva Zelanda: Nueva Gales del Sur, Nueva Zelanda, Queensland, Australia del Sur, Tasmania, Victoria.
3. Antártica y las islas subantárticas: Antártica / Islas subantárticas, Isla Macquarie.

2.1.2.6 Distribución en el Perú

Según la bibliografía *Porphyra columbina* se encuentra en los siguientes puntos del litoral peruano²¹:

1. Arequipa: Mollendo, Ático.
2. Ica: Isla Sta. Rosa, Lagunilla, Islas Chincha.
3. Lima: Entre Asia y Mala, Pucusana, La Herradura, Barranco, Islas Pescadores, Chancay.
4. La Libertad: Punta Negra, Cerro Prieto.
5. Piura: Paita, Talara.

2.1.3 Galactanos sulfatados

El componente mayoritario de las algas rojas son los galactanos sulfatados y debido a su importancia industrial a gran escala la mayoría de los estudios en estas algas están dirigidos a determinar su estructura²⁴. Ciertamente se tiene una serie de características diferenciales de estos galactanos, como lo es su cadena lineal, sus uniones glicosídicas, la configuración D- para carragenano y L- para los derivados del agar como lo es el porfirano, el cual se suele mencionar como D-L- híbrido; sin embargo, no se sabe a ciencia cierta si solo se trata de una mezcla de una serie de sustituciones de derivados enmascarando a la cadena lineal o si es una molécula polimérica que contiene ambas configuraciones y por ello es un híbrido²⁴. Se pueden clasificar como:

1. Polisacáridos del Grupo Agar: siendo su representante principal, el polisacárido neutro agarosa.
2. Polisacáridos del Grupo Carragenano: representados por sus varios tipos de carragenanas.
3. DL-Híbridos: Rompe las reglas establecidas para diferenciar carragenanos, a ello se suma que se suele encontrar L-galactosa en algas que tienen como principal componente carragenanas, la mayor proporción evidenciada fue 1:0.5 para carragenanas.

2.1.3.1 Porfiranos

2.1.3.1.1 Características estructurales

El galactano sulfatado de tipo porfirano está presente como el componente principal en las especies de *Porphyra* y es obtenido en cantidades copiosas por extracción en agua caliente de las algas de este género²⁵. Esto se comprende si se toma en consideración que la región intercelular y de la pared celular, xilosa y manano solubles en agua caliente, son los principales componentes de *Porphyra*²⁶.

Nunn y col.²⁵ informaron de la separación de D- y L- galactosa así como la presencia de 6-O-metil-D-galactosa, 3,6-anhidro-L-galactosa y un sulfato de hidrógeno en la proporción 1:1:2:1 a partir del polisacárido de *P. capensis*, la D- y L- galactosa obtenido del polisacárido fue el primer registro de separación por cristalización de un par de enantiómeros en la serie de azúcares así mismo fue el primer registro de 6-O-metil-D-galactosa en la revista Nature. Por esos años, alrededor de 1957, a pesar de su gran importancia como alimento, conferida por su alto contenido de proteínas, había escasas investigaciones de las algas rojas del tipo *Porphyra* en cuanto a sus polisacáridos.

En 1961 el porfirano de *P. umbilicalis* fue usado para el estudio de L-galactosa-6-sulfato, determinándose que dicho éster es lábil en medio alcalino dando 3,6-anhidrogalactosa²⁶.

Si se consideraban los residuos que presentaba se podría decir que el polisacárido presenta una estructura compleja y no simples unidades repetidas, para comprobar ello Rees y col.²⁷ emplearon 40 muestras de *Porphyra* de 6 especies, a las cuales les añadieron el análisis por variación estacional y ambiental; los resultados demostraron que expresando las proporciones en concentraciones molares la suma de 3,6-anhidro-L-galactosa y L-galactosa-6-sulfato, como contenido de L-galactosa, resultaba constante en las muestras por lo que se sugirió que eran intercambiables entre polisacáridos, el aumento de uno es la disminución del otro, a lo que se sumaba la hipótesis que señalaba a la L-galactosa-6-sulfato precursor biológico del 3,6-anhidro-L-

galactosa y que implicaría a su vez la existencia de una enzima que podría convertir el sulfato en el anhidro L-galactosa.

De igual forma ocurría entre el 6-O-metil-D-galactosa y la D-galactosa, apoyándose a su vez en estudios anteriores basados en hidrólisis parcial ácida; estos estudios sugerían que el porfirano es una cadena de unidades alternadas (1,3)- β -D-galactosa y (1,4)- α -L-galactosa, algunas de las unidades D-galactosa siendo 6-O-metiladas y de las unidades L-galactosa como 6-sulfato o anhidro²⁸.

A esto se suma estudios posteriores de los enlaces glicosídicos, partiendo de L-galactosa-6-sulfato que por eliminación alcalina fue convertida en 3,6-anhidrogalactosa y luego metilada. La hidrólisis y posterior cromatografía gas - líquido (GLC) mostró solo la presencia de dos productos metilgalactosa (2, 4, 6-tri-O-metilgalactosa y 3,6-anhidro-2-O-metilgalactosa) que por sus concentraciones pueden ser visualizados en cromatografía en papel y GLC, considerando estos resultados la posibilidad de una estructura ramificada quedaba desterrada. Se realizaron también estudios confirmatorios de enlaces β de derivados de tetrametilagarobiosa por resonancia magnética nuclear de hidrógeno (RMN-¹H), basándose en la regla general que en el espectro de glicósidos y glicósidos metilados la señal del protón anomérico aparece primero antes que cualquier otro²⁸.

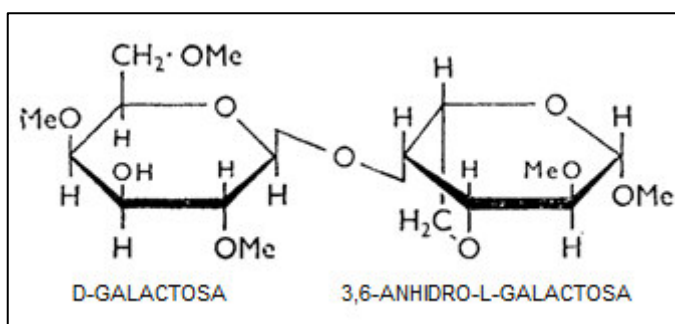


Figura N° 3. Dímero metilado derivado de la hidrólisis del porfirano metilado²⁸.

Otro gran aporte de Rees y col²⁷ fue señalar que el polisacárido extraído por agua caliente de los miembros del género *Porphyra* tiene una cantidad aproximadamente igual de D- y L- galactosa que lo derivados obtenidos en procesos de purificación por lo cual en los procesos de extracción actual de

porfirano el polisacárido obtenido por este método es el estudiado³⁰. Más palpable aun es el caso de *Porphyra pseudolanceolata* Krish, extraída del mar peruano, en el cual el polisacárido total, obtenido por extracción en agua caliente y purificado con etanol, y las fracciones obtenidas de este por hidrólisis mostraron propiedades cromatográficas similares restringiéndose el estudio al análisis del polisacárido total³¹.

Diversos textos de esa época a la actualidad afirman lo anteriormente expuesto añadiendo información de las diferentes *Porphyras* y enfatizando la diversidad de contenido de las unidades de azúcares presentes en los porfiranos como el caso de *P. umbilicalis* que rindió manano en extracción con hidróxido de sodio²⁶ o *P. tenera* del que se reporta se aislaron glucosa, pentosa y metilpentosa²⁴.

También se sumaron nuevos métodos como la degradación enzimática del porfirano de *Porphyra umbilicalis* por una β -agarasa I, altamente purificada, de *Pseudomonas atlántica*. Esta enzima rompe el sitio de reducción de unidades β -neoagarobiosa. Después de separación por diálisis de las moléculas de mayor y menor peso y ser separados por intercambio catiónico, la filtración de gel de los oligosacáridos aniónicos reveló dos nuevos tetrasacáridos monosulfatados que al ser leídos en espectroscopia de RMN-¹³C permitía determinar en contenido de sulfato del porfirano³².

La mayoría de estudios actuales centran su atención en determinar las características estructurales de las fracciones del polisacárido, ya sean fracciones nativas o modificadas reportando en todos los casos su contenido de sulfato ya que al relacionarlo con actividades biológicas siempre es un parámetro de consideración, así como el contenido de 3,6-anhidrogalactosa y los monosacáridos presentes con el fin de establecer, si los datos así lo permiten, relaciones entre la composición y la actividad en ensayo³³.

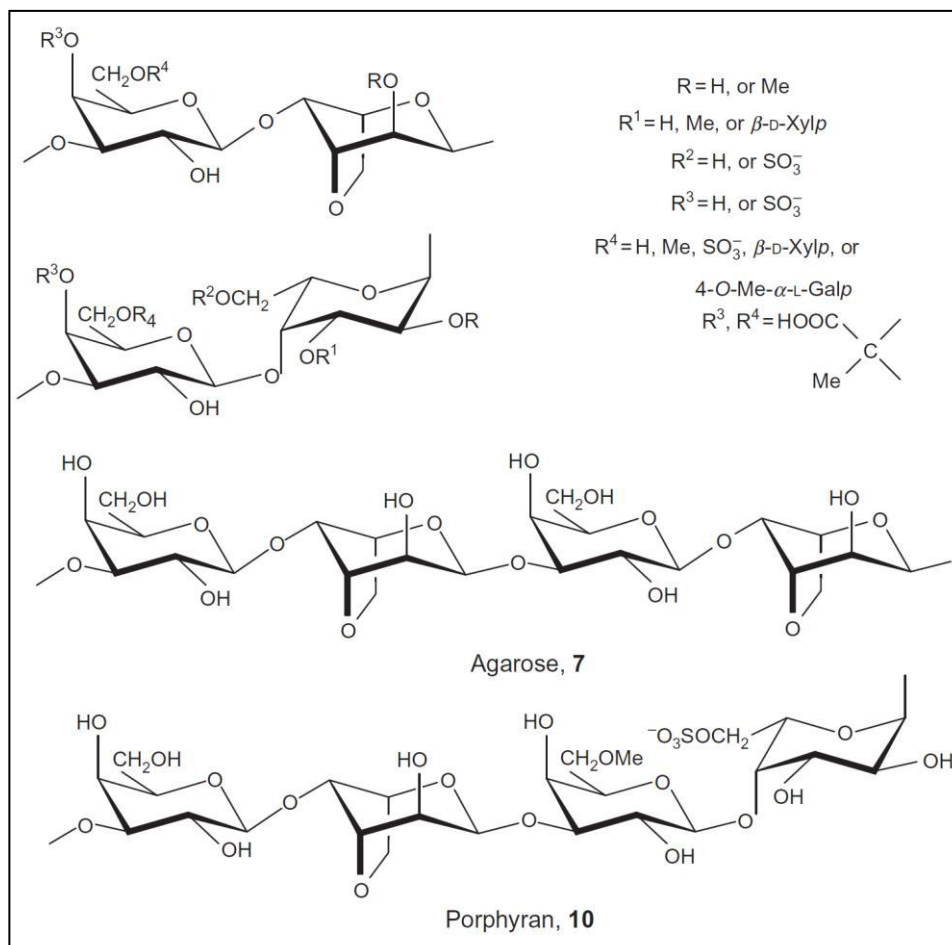


Figura N° 4. Estructuras de porfiranos comparados con los polisacáridos del grupo agar²⁴.

2.1.4. Actividad biológica de las algas marinas

Los polisacáridos sulfatados de las algas marinas han demostrado en años recientes una amplia variedad de actividades biológicas. Su interés y estudio, por lo tanto, tiene una directriz de crecimiento exponencial. Algunas de las actividades biológicas conferidas a las algas y soportadas por estudios científicos son las siguientes^{1,2,34}:

Antioxidantes (*in vitro* e *in vivo*); preventivas y terapéuticas contra enfermedades degenerativas; potencial prevensor y terapia para el síndrome metabólico: obesidad, dislipidemia, diabetes, hipertensión; anticoagulante; anticancerígeno; antialérgico, antiinflamatorio e inmunomodulador; modulador endocrino; fitoestrogénico; protección y regeneración de órganos y tejidos;

macronutrientes e ingrediente alimentario funcional (contiene carbohidratos, proteínas y lípidos).

El entendimiento de la relación estructura – actividad, por otro lado, se ve menguada debido a las dificultades que presenta la identificación de la estructura química, uno de los enfoques de investigación para establecer esta relación se basa en obtener información de estudios de polisacáridos sulfatados, especialmente el tipo del grupo éster sulfato que se ha reportado influye en su comportamiento biológico y farmacológico, de invertebrados los cuales tienen una estructura regular y son más fáciles de estudiar³⁴.

2.1.4.1 Actividad biológica del porfirano

Las Bangiales, especialmente las *Porphyras*, consideradas un importante alimento desde la antigüedad por su alto contenido de proteínas, han sido estudiadas posteriormente por su contenido de polisacárido sulfatado siendo estos últimos los componentes más abundantes en sendas *Porphyras*³⁵.

El polisacárido del alga roja *Porphyra yezoensis*, una de las algas, sino el alga más estudiada del género, tiene múltiples funciones biológicas, como anticoagulante, antisenescente, antifatigante, anticancerígeno³⁶ así como un posible efecto sobre la proliferación de linfocitos, modulación inmune, y células de Sertoli³⁷. Las propiedades antioxidante *in vivo* y más aún *in vitro* han sido estudiadas para sendas algas del género *Porphyra*, como el caso de *P. haitanensis* que exhibe *in vitro* mejor capacidad de barrido de radicales superóxido e hidroxilo y que posteriormente podrían ser utilizados en la industria alimentaria y farmacéutica³⁸. El porfirano reporta una gama de actividades que brevemente se pueden citar como sigue:

- a) Efecto antialérgico: efectivo contra la hipersensibilidad inducida por 2, 4, 5-trinitrobenzeno por supresión de niveles séricos de IgE y IFN- γ ³⁹.
- b) Actividad inmunomoduladora: eleva la respuesta de los anticuerpos primarios (IgM) y estimula los macrófagos^{39,40}.
- c) Anticoagulante: se conoce su acción anticoagulante, sin embargo recientemente su interés va en la reducción de lípidos del suero y

prevención de trombosis. Se estudian, por ejemplo, suplementos de mezclas de algas con este fin⁴¹.

- d) Actividad antioxidante y antisenecente: incrementa la actividad de las enzimas antioxidantes glutatión peroxidasa y superóxido dismutasa, las que actúan con vital importancia en la peroxidación lipídica previniendo el daño celular^{42,43}.
- e) Actividad antihiperlipídica, hipocolesterolémica, hipoglicemiante e hipotensora⁴⁴.
- f) Agente hepatoprotector: evidenciado contra el daño causado por tetracloruro de carbono en ratones. Su mecanismo se relaciona al barrido de radicales libres ensayado *in vitro* y al incremento de enzimas antioxidantes *in vivo*⁴².
- g) Actividad anticancerígena: relacionada, posiblemente, con su contenido de éster sulfato ya que el grado de sus propiedades polianiónicas es el que determina su actividad⁴⁵.

2.1.5 Usos y forma de consumo actual de *Porphyra*

Indudablemente si se tuviera que mencionar solo un uso de las *Porphyras* este sería su empleo como alimento. Es conocido como parte de la dieta desde la antigüedad en los países orientales y, cada vez por más motivos, parte de la dieta actual de los mismos; sin embargo, en el mundo esto depende del país y continente al que nos refiramos y por ende la cultura alimentaria.

Centrándonos en Sudamérica y en *Porphyra columbina*, ésta se consume en Perú, Chile y Argentina de los cuales Argentina en el 2002 ya tenía la iniciativa de preparar alimentos a partir del alga que formen parte de su dieta a nivel nacional; en tanto en Perú había poca exportación de algas⁴⁶, mientras que su forma de consumo es en preparados principalmente en los departamentos de Cusco y Arequipa, la famosa “Timpuscca” de Arequipa tiene entre uno de sus 16 variados ingredientes al cochayuyo, nombre común del alga, y su consumo fue publicitado en el 2010 por el Instituto Nacional de Salud (INS) como parte de una campaña de nutrición infantil⁴⁷. Así mismo Chile también busca nuevas formas de poder agregarlo a la dieta de la población invirtiendo en

investigaciones para dicho fin⁴⁸ y actualmente exporta para varios países puesto que los sudamericanos no tenemos predisposición por este tipo de alimento en nuestra dieta, cabe destacar que *Porphyra columbina* es considerada de sabor agradable respecto de otras algas.

La presencia de yodo y alginato es menor al encontrado en las algas pardas por lo cual estas últimas se emplean en industria cosmética⁴⁹ o en la industria farmacéutica⁴⁶. Hay, por otro lado, el uso folklórico de *Porphyra* en la medicina tradicional china donde se emplea hasta hoy para disolver la flema, disipar el calor y favorecer la diuresis⁵⁰.

2.1.6 Perspectivas Futuras

En definitiva los estudios estructurales del polisacárido sulfatado de *Porphyra*, el porfirano, y sus derivados continuará pues su complejidad y diversidad hace difícil un consenso general con la información actual además del enorme interés en determinar sus mecanismos de acción en modelos *in vivo* ya que reportan una gran variedad de actividades farmacológicas por alga estudiada³⁴ e *in vitro*, más aun de derivados del polisacárido que pueden tener una gran utilidad en la industria alimentaria^{1,38}.

Así mismo se puede prever el uso de técnicas modernas y altamente específicas en su estudio como lo ha sido el empleo de la degradación ultrasónica para porfirano⁵¹ o la determinación de una especie por técnicas moleculares²⁰ pues se entiende que entre la técnica sea más específica y sensible los resultados serán más fiables.

Una de las mayores preocupaciones futuras sería el alto peso molecular del polisacárido que daría lugar a una baja biodisponibilidad⁵². En el Perú la búsqueda de vías de industrialización de las especies de algas disponibles en la naturaleza de forma rentable es un tema de gran interés pues hasta la actualidad no hay una verdadera industria de algas a pesar de ser un país con gran variedad de las mismas, aunque de volúmenes pequeños para una escala industrial, y con aportes de investigaciones de distintas especies por parte de universidades y centros de investigación.

2.2 Capacidad Antioxidante

2.2.1 Radicales libres

Se considera como radical libre a cualquier átomo, molécula o fragmento molecular que en su estructura presenta uno o más electrones desapareados en el orbital más externo, esta configuración lo hace muy inestable^{53,54}, es por ello que tienden a atraer hacia sí un electrón de moléculas estables con la finalidad de alcanzar su propia estabilidad electroquímica⁵⁵. En contraste, la vida media biológica del radical libre es de microsegundos debido a la gran capacidad de reacción con cualquier sustancia que se encuentre a su alrededor⁵⁵ y partiendo de este punto, el hecho de que el radical libre se estabilice al captar o ceder electrones convirtiendo a las moléculas con las que interacciona en un nuevo radical, explica las reacciones en cadena que se producen en los sistemas biológicos los cuales solo se detienen al reaccionar dos radicales libres entre sí⁵⁶.

Los radicales libres derivan de tres elementos atómicos: oxígeno, nitrógeno y azufre, creando así las especies reactivas del oxígeno (ROS), del nitrógeno (RNS) y del azufre (RSS). Los ROS incluyen al anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radical hidropéroxilo (HO_2^{\cdot}), el radical hidroxilo ($\cdot OH$), el óxido nítrico (NO), y otras especies como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), oxígeno singlete (1O_2), ácido hipocloroso (HOCl) y el peroxinitrito ($ONOO^{\cdot}$). Los RNS derivan de NO al reaccionar con $O_2^{\cdot-}$, y forman $ONOO^{\cdot}$; los RSS se forman fácilmente por la reacción de ROS con tioles⁵⁷; de ahí que los radicales libres de mayor importancia sean los ROSs.

2.2.1.1 Mecanismos de generación de radicales libres

El mecanismo principal por el que se originan los radicales libres en los organismos vivos es por la adición de un electrón a una molécula estable, siendo la fuente más importante las reacciones de óxido-reducción univalente en la que está presente el oxígeno⁵⁸.

La formación de ROS se da por disociación del hidropéroxido a pH 7.4 para formar anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), este anión es extremadamente reactivo y puede

interaccionar con un número de moléculas para generar ROS ya sea directamente o a través de procesos catalizados por metales. El anión superóxido puede también ser detoxificado a peróxido de hidrógeno a través de una reacción de dismutación con la enzima superóxido dismutasa (SOD) (a través de la reacción de Haber-Weiss) y finalmente a agua por la enzima catalasa (CAT). Si el peróxido de hidrógeno reacciona con el hierro catalizado como Fe^{2+} , da lugar a la reacción de Fenton formando el radical hidroxilo (OH^\cdot)⁵⁹.

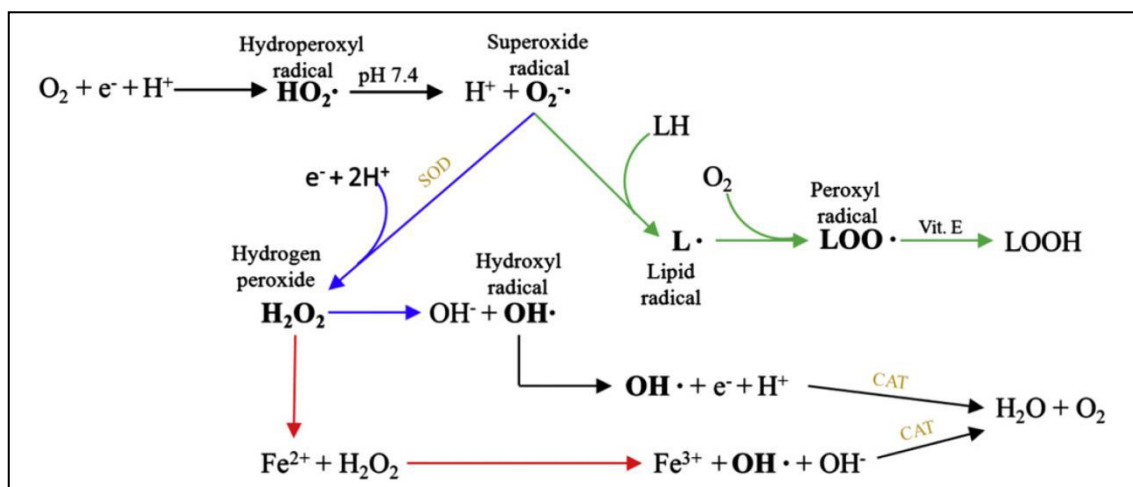


Figura N° 5. Generación de ROS⁶⁰: Las flechas azules representan la reacción de Haber-Weiss y las flechas rojas la reacción de Fenton.

Como se aprecia en la figura N° 5, la generación de superóxido da lugar a otras especies reactivas por lo que mencionamos algunas fuentes generadoras de radicales⁶¹:

Cadena transportadora de electrones en la mitocondria, hay donación de electrones al oxígeno generando radicales libres.

Acción enzimática de la xantina oxidasa.

La autooxidación de la hemoglobina, el grupo HEM unido a Fe^{+2} por captación de oxígeno se oxida a Fe^{+3} y produce radical superóxido.

La reacción de ROS con tioles forma disulfito que en oxidaciones posteriores puede resultar, si reaccionan con un tiol reductor, en formación de ácido sulfénico, un RSS⁶².

2.2.1.2 Daños producidos por los ROSs

La mayor parte del oxígeno captado por las células de nuestro cuerpo es convertido en agua durante la respiración mitocondrial, sin embargo menos del 5% es convertido en ROSs. Estas sustancias son altamente tóxicas. Si se les permite su acumulación pueden llegar a destruir todas las macromoléculas de las células como son los lípidos, proteínas, mitocondrias y DNA nuclear. El estrés oxidativo, producto del desbalance entre la producción de ROSs y la capacidad de los sistemas biológicos de detoxificar las especies intermediarias o el daño producido, y la posterior muerte celular, daño de tejido, se produce en mitocondrias disfuncionales que generan ROSs de forma excesiva dando lugar a una serie de patologías⁶³.

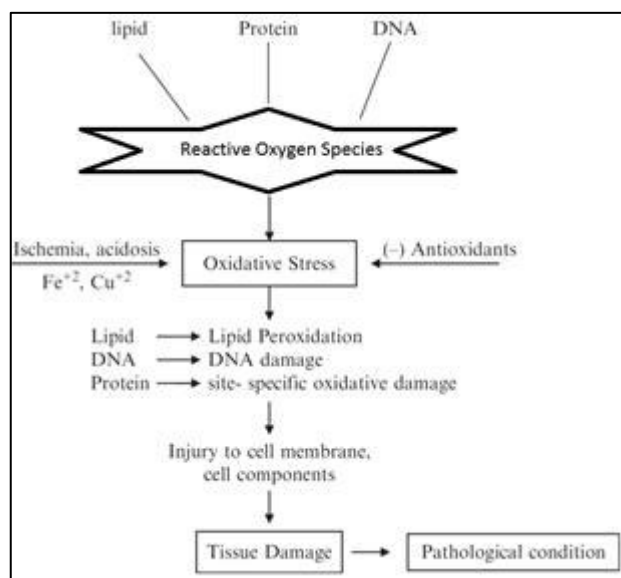


Figura N° 6. Patogénesis del tejido dañado⁶³.

Los lípidos son el principal objetivo para las reacciones de los radicales libres⁶³ y las proteínas son las más susceptibles de degradación por ROSs ya que estos dañan el ADN causando variadas modificaciones de las bases orgánicas de los nucleótidos con consecuencias fatales para la célula⁶⁴.

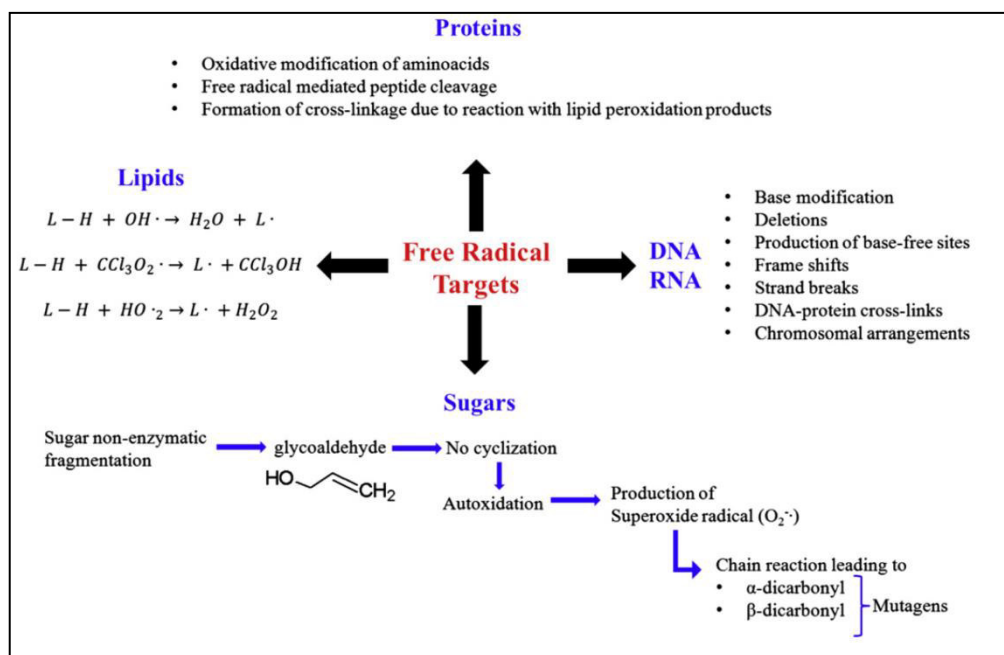


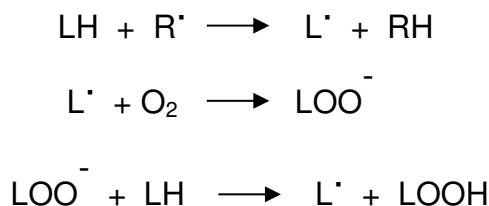
Figura N° 7. Objetivos de los ROSs⁶⁰. Se indican las principales moléculas con las que los radicales libres actúan y las alteraciones que produce.

2.2.2 Peroxidación lipídica

La peroxidación lipídica es el proceso de oxidación de los lípidos por radicales libres⁶⁵, el cual tiene una etapa de iniciación, propagación y terminación⁶⁶. La peroxidación lipídica en membranas biológicas ha sido considerada como uno de los mayores mecanismos de injuria celular en organismos aeróbicos sujetos a estrés oxidativo⁶⁷.

Esta consideración se da debido a que los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs - polyunsaturated fatty acids) son especialmente susceptibles a la peroxidación porque poseen tres o más uniones carbono-carbono con doble ligadura, que le confiere una zona de enlace lábil que permite que un radical libre ($R\cdot$) como el $OH\cdot$ le sustraiga un átomo de hidrógeno. El radical lipídico ($L\cdot$) formado sufre un reordenamiento molecular y en presencia de oxígeno molecular da lugar al radical peroxilo ($LOO\cdot$). El radical peroxilo puede sustraer un átomo de hidrógeno de otra molécula vecina (LH), esta puede ser otro ácido graso insaturado, formándose así un hidroperóxido ($LOOH$) y un nuevo $L\cdot$, entrando la peroxidación en la etapa de propagación la cual consta de una

reacción en cadena o autocatalítica, esto quiere decir que una vez iniciada continúa desarrollándose por sí misma⁶⁷:



El grado de propagación de la reacción en cadena que se produce depende de una serie de factores dentro de los cuales destacan la concentración de oxígeno, composición de ácidos grasos, relación de lípido-proteína y presencia de antioxidantes. Los hidroperóxidos son los productos primarios de la lipoperoxidación y en condiciones fisiológicas son relativamente estables⁶⁷. Los grupos $^{\bullet}\text{OOH}$ de los hidroperóxidos llevan a una distorsión del espacio hidrofóbico y a una pérdida de la función biológica de las membranas⁶⁸.

La peroxidación de lípidos sigue propagándose hasta que llega a la etapa de terminación cuando dos hidroperóxidos reaccionan entre sí dando tetróxidos o cuando son neutralizados por los antioxidantes. Los tetróxidos son inestables, al romperse generan aldehídos como el malondialdehído (MDA), el cual es el principal producto indicador de la lipoperoxidación así como 4-hidroxinonenal (4-HNE), siendo estos dos los aldehídos más abundantes⁶⁸.

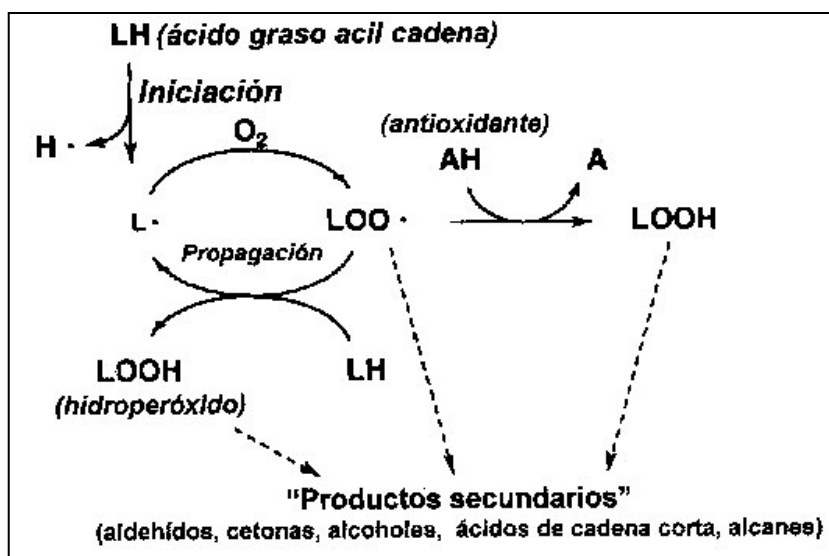


Figura N° 8. Proceso de la peroxidación lipídica⁶⁶.

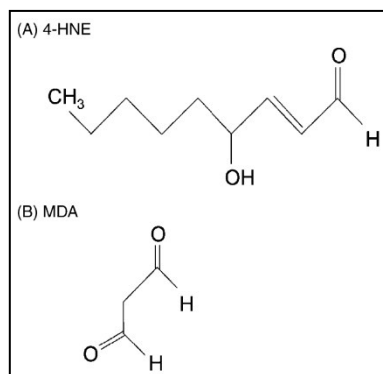


Figura N° 9. Estructuras de 4-hidroxinonenal (A) y malondialdehído (B)⁶⁸.

2.2.3 Mecanismos de defensa contra el daño oxidativo

En los seres humanos, los antioxidantes son las sustancias que nos protegen contra el daño oxidativo; se clasifican en sistemas enzimáticos y no enzimáticos⁶⁹.

2.2.3.1 Antioxidante

Se considera como tal a “cualquier sustancia que elimina, previene o remueve el daño oxidativo para una molécula objetivo”⁷⁰.

El antioxidante puede ser efectivo al inhibir las reacciones de oxidación de radicales libres cuando inhibe la formación de radicales lipídicos libres; cuando quelan metales; a través de sinergismo con otros antioxidantes; cuando actúan como agentes reductores, los cuales convierten hidroperóxidos en compuestos estables; como inhibidores de enzimas prooxidativas (lipooxigenasas) entre otros^{71,72}.

2.2.3.1.1 Sistemas antioxidantes

Los radicales libres cumplen una función importante en variados procesos homeostáticos como lo es la destrucción de microorganismos por fagocitosis, entre otras. Son las cantidades excesivas de estos, y no solo su presencia, las que generan efectos tóxicos al haber daño celular⁷³. La clasificación de los antioxidantes se puede dar por su sitio de acción, intracelular o extracelular; por

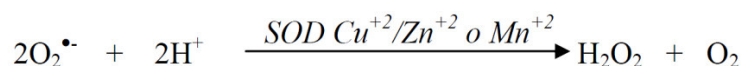
el modo en el que protegen, o según su mecanismo de acción, enzimáticos y no enzimáticos, estando este último como la clasificación con mayor aceptación y por ende la más empleada actualmente⁷⁴.

2.2.3.1.2 Antioxidantes enzimáticos

2.2.3.1.2.1 Superóxido dismutasa (EC 1.15.1.1)

La enzima superóxido dismutasa (SOD) es una metaloenzima regulada por la concentración del sustrato sobre el cual actúa. Presenta isoformas: CuZn-SOD, Mn-SOD y Fe-SOD. La Fe-SOD se encuentra generalmente en procariotas, mientras que en las células eucariotas existen tres tipos de SOD, cuya localización es diferente: Mn-SOD es mitocondrial, CuZn-SOD es citosólica y CuZn-SOD es extracelular⁷⁵.

La función fisiológica de la SOD es catalizar la reacción de dismutación del radical libre superóxido ($O_2^{\bullet -}$) a peróxido de hidrógeno (H_2O_2), antes de que reaccione con otras moléculas biológicas susceptibles, para esta reacción no es necesaria la presencia de cosustrato. Así mismo, la enzima SOD es inhibida por peróxido de hidrógeno⁷⁶.

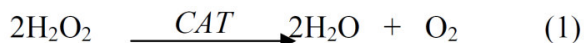


2.2.3.1.2.2 Catalasa (EC 1.11.1.6)

La catalasa (CAT) es una de las enzimas más ampliamente distribuidas en el organismo y una de las más abundantes de la naturaleza. Su actividad varía de acuerdo al tejido en el que se encuentra, resultando más elevada en el hígado y los riñones⁷⁷.

La CAT está involucrada en la destrucción del peróxido de hidrógeno generado durante el metabolismo celular. Presenta dos funciones: la catalítica y la peroxidativa. En la reacción catalítica, el donador es otra molécula de H_2O_2 . Esta reacción sólo puede ser realizada por la enzima en su forma tetramérica (1). En la reacción peroxidativa la enzima puede utilizar como donantes de

hidrógeno al metanol, etanol, ácido fórmico, formol y formaldehído. Esta reacción se puede realizar con monómeros, dímeros y tetrameros (2)⁷⁸.



2.2.3.1.2.3 Glutación peroxidasa (EC 1.11.1.9)

La glutación peroxidasa (GPx) es el nombre general de una familia de enzimas con actividad peroxidasa⁶⁶. La GPx se define como una glicoproteína tetramérica que tiene como cofactor al selenio. En las células animales se encuentra en la matriz mitocondrial y en el citosol. Se han descrito isoformas de GPx, que difieren tanto en su ubicación como en su especificidad hacia el sustrato. La GPx fosfolípido hidroperóxido, tiene como función principal proteger al organismo contra la peroxidación lipídica a nivel de membranas y de las lipoproteínas de baja densidad⁷⁹, reduce el H_2O_2 libre del agua en presencia de glutación (GSH) como agente reductor (a) y reduce los hidroperóxidos lipídicos a sus correspondientes alcoholes (b)⁸⁰.

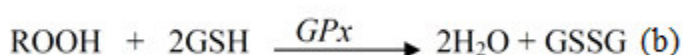
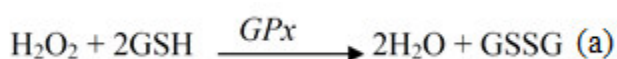


Tabla N° 1. Antioxidantes enzimáticos⁸¹.

ANTIOXIDANTES ENZIMÁTICOS		
Antioxidante	Ubicación celular	Función fisiológica
Superóxido dismutasa	Citoplasma (SOD-1) Mitocondria (SOD-2) Extracelular (SOD-3)	Dismutación de radicales superóxido.
Glutación peroxidasa	Citoplasma y mitocondria	Elimina el peróxido de hidrógeno y los hidroperóxidos orgánicos
Catalasa	Citoplasma y mitocondria	Elimina peróxido de hidrógeno.

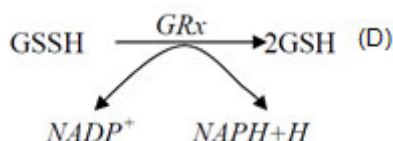
2.2.3.1.3 Antioxidantes no enzimáticos

Son moléculas hidrofóbicas o hidrofílicas, presente en la dieta ingerida por los seres vivos, sobre todo en las frutas y verduras. Tienen como principales características ser sustancias capaces de neutralizar un único radical libre por molécula (cazadores estequiométricos), solo actúan a concentraciones elevadas y tienen un papel secundario frente a los antioxidantes enzimáticos⁸².

En el organismo los antioxidantes no enzimáticos hidrofílicos se ubican principalmente en el citosol, matriz mitocondrial, matriz nuclear y en fluidos extracelulares; entre ellos están la glutatión, vitamina C, flavonoides, polifenoles, etc.; mientras que los del tipo hidrofóbicos se encuentran asociados a la membrana celular, entre ellos destacan la vitamina E⁸³.

2.2.3.1.3.1 Glutatión

El GSH es un tripéptido, endógeno, de ácido glutámico, cisteína y glicina. Su capacidad antioxidante se debe a la capacidad reductora del grupo tiólico del resto de cisteína. Actúa como antioxidante en reacciones enzimáticas con la GPx o en reacciones no enzimáticas. Protege de la oxidación a grupos –SH esenciales de las proteínas, pudiendo también actuar sobre enzimas inactivadas por oxidación de sus grupos –SH. En presencia de GPx reduce el H₂O₂ a agua, dando lugar a su forma oxidada (GSSG) (C) por la formación de un puente disulfuro entre dos de esas moléculas; gracias a la enzima glutatión reductasa (GRx) es regenerado a su forma oxidada (D) en presencia de NADP^{+61,84}.



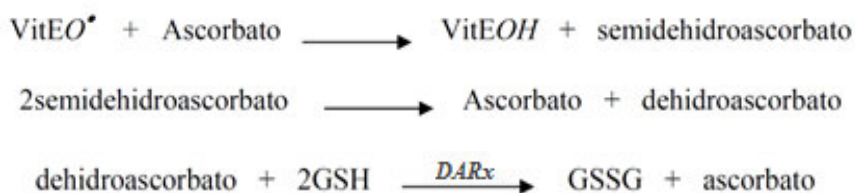
2.2.3.1.3.2 Vitamina E

La vitamina E es liposoluble, presenta variadas isoformas de las cuales cuatro son tocoferoles (α , β , γ y δ). El α -tocoferol es el más abundante y el δ -tocoferol el antioxidante más potente⁸⁵.

La vitamina E es el único antioxidante principal rompedor de cadena encontrado en el plasma, células rojas y tejido, permitiendo esto proteger la integridad de las estructuras lipídicas, principalmente membranas; detiene la peroxidación lipídica por donación de su hidrógeno fenólico a los radicales peroxilo formando radicales tocoferoxilo que a pesar de ser también radicales, no son reactivos y no pueden continuar la reacción de la cadena oxidativa⁸⁶.

2.2.3.1.3.3 Vitamina C

También llamado L-ácido ascórbico es una sustancia hidrosoluble presente principalmente en los alimentos. Se caracteriza por su capacidad para actuar como un potente agente reductor aunque su función fisiológica aún no está bien aclarada^{87,88}. La vitamina C es capaz de reaccionar con los radicales libres de oxígeno: superóxido, hidroperóxidos y el radical hidroxilo; para formar semidehidroascorbato, del cual se forma dehidroascorbato que es reducido nuevamente a ascorbato por la dehidroascorbato reductasa (DARx), reacción que requiere de glutatión reducido⁸⁸.



2.2.3.1.3.4 Vitamina A

También llamado retinol es un carotenoide producido en el hígado como resultado del rompimiento del β -caroteno. Están presentes alrededor de doce formas de vitamina A que pueden ser aisladas. La actividad antioxidante es

conferida por la habilidad para combinarse con radicales peroxilo antes que estos propaguen la peroxidación de los lípidos⁹⁰.

2.2.3.1.3.5 Coenzima Q10

La coenzima Q10 (CoQ10) está presente en todas las células y membranas, tiene un rol importante en la cadena respiratoria y en el metabolismo celular. CoQ10 actúa previniendo la formación de radicales peroxilo lipídicos, aunque se ha reportado que esta coenzima puede neutralizar estos radicales aun después de su formación. Otra importante función es la habilidad de regenerar vitamina E; algunos autores señalan que este proceso de regeneración es similar al de la vitamina E a través del ascorbato (vitamina C)⁹¹.

2.2.4 Usos actuales, perspectivas futuras

Los antioxidantes considerados esenciales en el mantenimiento de la vida han sido estudiados en cuanto a su actividad clínica, se establece que su función es evitar la oxidación de sustancias que puedan provocar alteraciones fisiológicas⁹².

Estudios realizados han demostrado que la expresión antioxidante enzimática está drásticamente reducida en enfermedades cutáneas, por otro lado el uso de miméticos de la SOD aplicados tópicamente en la piel en modelo murino carcinógeno de piel sumado a la dieta de plantas medicinales mostró significativa disminución de la incidencia tumoral⁹³. Una aseveración demostrable es que prolongan la vida en los seres vivos, en estudios con moscas transgénicas con tres copias de gen SOD y CAT, se observó que vivían 30% más tiempo comparadas con la mosca testigo, grupo control, también presentaron menor daño proteico⁹⁴.

Estudios diversos en China se vienen realizando desde hace más de una década con polisacáridos y sus fracciones provenientes de algas marinas rojas y otras, como verdes y pardas, que emplean de forma industrial para demostrar el retardo del envejecimiento o la prolongación de la vida^{43,95}. Diversas plantas medicinales como *Solanum nigrum* muestran terapia antioxidante al tener

propiedades hepatoprotectoras y mantener niveles altos de SOD y de GSH que ayudan a reparar tejidos hepáticos dañados en animales tratados con tetracloruro de carbono, estudios comparativos de estas y las algas marinas se vienen realizando con más frecuencia e interés⁹⁶.

Tabla N° 2. Ejemplo de enfermedades y posibles terapias antioxidantes⁹⁷.

ENFERMEDAD	ÓRGANO	ANTIOXIDANTE
Infertilidad masculina	Espermatozoide	Zn
Infertilidad femenina	Hormona luteinizante	SOD-1
Diabetes	Células beta pancreáticas	SOD-extracelular
VIH	Plasma	SOD
Cáncer	Sangre, células, cancerígenas, hígado, pulmón, riñón, piel, ovarios, próstata	SOD, GPX, catalasa
Alzheimer, Huntington	Neuronas	SOD-1, SOD, GPX
Parkinson	Neuronas	Catalasa, polifenoles
Daño cerebral	Oclusión arterial	SOD, GPX SOD
Daño post-isquémico	Cerebro	Catalasa, SOD-1
Enfermedad de Crohn	Tracto gastrointestinal	SOD, GPX, catalasa
Alergia al polen	Células sanguíneas	SOD, GPX, catalasa
Pérdida auditiva	Cóclea	SOD-1

En tanto la variedad de pruebas *in vitro* no permite una adecuada comparación de los resultados obtenidos de diversos estudios de actividad antioxidante, el estrés oxidativo se muestra como una línea de estudio interesante enfocándose los estudios en caracterizar mejor la secuencia de eventos que suceden desde la liberación del exceso de radicales hasta el daño celular⁹⁸. Hay muchos estudios que en la actualidad se van enfocando a buscar compuestos que tengan comportamiento parecido a la SOD⁸¹. Algo bastante interesante de estudio futuro es determinar marcadores para estrés oxidativo a través de estudios genéticos, que permitan identificar poblaciones expuestas a daños celulares y con esto proporcionar terapias antioxidantes previas al desarrollo de las enfermedades asociadas a los radicales libres⁹⁸.

2.3 Capacidad Hipolipemiente

Presentan capacidad hipolipemiente las sustancias capaces de disminuir los lípidos séricos, lo que da lugar a la disminución de la morbilidad por enfermedad cardiovascular asociada a los niveles anormales de lípidos en suero⁹⁹; por lo cual, el estudio de los lípidos y las enfermedades relacionadas nos permiten determinar la actividad hipolipemiente relacionada a una sustancia.

2.3.1 Metabolismo de los lípidos

El término lípido se utiliza para clasificar un gran número de sustancias de muy diferentes características fisicoquímicas constituidas principalmente de carbono, hidrógeno y oxígeno, siendo su solubilidad en disolventes orgánicos no polares la propiedad común para su clasificación¹⁰¹. El metabolismo, catabolismo y anabolismo¹⁰⁰, enfocado en los lípidos nos lleva al estudio de sus principales fuentes endógenas y exógenas, su composición y sus funciones *in vivo*¹⁰².

Los lípidos constituyen alrededor del 40-45% de la ingestión calórica diaria en los países desarrollados. La mayor parte de esta energía proviene de los triacilgliceroles. El organismo digiere, absorbe, resintetiza y transporta los lípidos; emplea como máximo un 30% de las calorías provenientes de dietas grasas y el resto es almacenado¹⁰².

2.3.1.1 Colesterol

El colesterol es un compuesto alicíclico que tiene como precursor al ciclopentanoperhidrofenantreno, presenta un anillo de fenantreno completamente reducido, unido a un ciclo de cinco átomos de carbono, formando cuatro anillos fusionados que se identifican con las letras A, B, C y D.

La presencia del grupo hidroxilo en el C-3, tiene una importante función en su solubilidad ya que al esterificarse, generalmente con ácido linoleico, forma éster colesterol, la forma más abundante del colesterol, aproximadamente el 70% del colesterol unido a lipoproteínas del plasma está en forma de ésteres

de colesterol y solo un 30% se encuentra libre. La posición de los sustituyentes en los anillos está relacionada con grupo metilo unido al C-10 en posición β ¹⁰³.

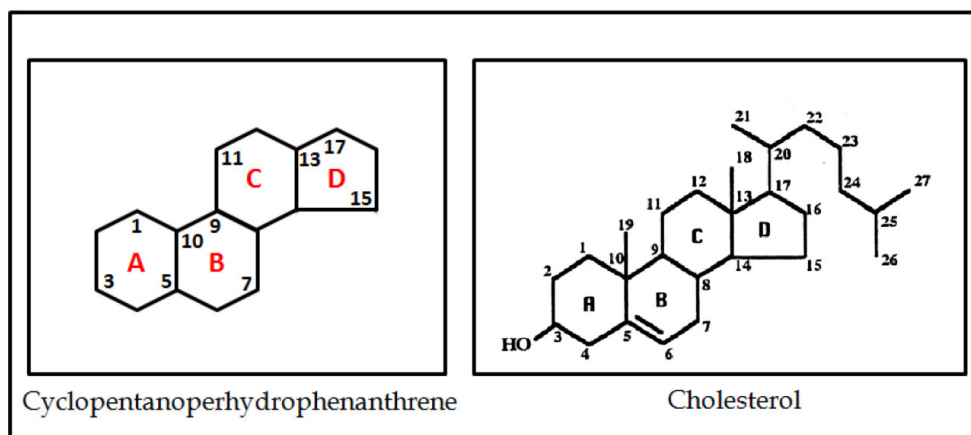


Figura N° 10: Estructuras de ciclopentanoperhidrofenantreno y colesterol¹⁰³.

Es el esteroide, isoprenoide esteroideo, mayoritario en el hombre y componente principal de las membranas de las células animales, participa en la modulación de la fluidez de la membrana y es particularmente abundante en las estructuras mielinadas del cerebro y del sistema nervioso central¹⁰⁴. Actúa como precursor de todas las hormonas esteroideas, de la vitamina D, de los ácidos biliares y junto a otros lípidos precipitan al estrato córneo de la piel confiriéndole propiedades protectoras frente a factores externos¹⁰⁵.

Está presente en la dieta y se puede absorber lentamente desde el tubo digestivo a la linfa. Es muy liposoluble y su altísima solubilidad en la sangre se debe a la presencia de lipoproteínas plasmáticas que tienen la capacidad de fijar y por lo tanto solubilizar grandes cantidades de colesterol. Se pueden determinar dos grandes fuentes de colesterol: colesterol proveniente de la dieta, colesterol exógeno, o de la síntesis de novo, colesterol endógeno, que se realiza principalmente en el hígado y en menor grado en el intestino^{106,107}.

La homeostasis del colesterol mantiene un mecanismo que coordina el consumo de colesterol en la dieta, la tasa de síntesis de colesterol endógeno en el hígado e intestino y la utilización de colesterol por las células. Así, cuando se reduce la cantidad de colesterol en la dieta, se incrementa la síntesis de colesterol en el hígado y en el intestino para satisfacer las necesidades de los

órganos y tejidos restantes¹⁰¹. Por el contrario cuando aumenta la cantidad de colesterol de la dieta, se suprime casi totalmente la síntesis del colesterol en el hígado y en el intestino. Así, la velocidad de síntesis de novo de colesterol está en relación inversa a la cantidad de colesterol que el cuerpo ingiere por alimentación¹⁰⁸.

2.3.1.1.1 Vía del mevalonato

La biosíntesis de colesterol sirve como eje central del metabolismo de numerosos procesos biológicos, la vía del mevalonato es la principal productora de colesterol y por tal motivo ha sido ampliamente estudiada. Esta vía también sirve de síntesis de isoprenoides no esteroideos, tales como dolicol, hemo-A, isopentenil ARNt y ubiquinona¹⁰⁹.

La vía del mevalonato se muestra muy interesante como objetivo terapéutico no solo en las reacciones relacionadas al colesterol sino de los isoprenoides en general¹¹⁰. Estas moléculas esenciales para el crecimiento celular son de interés en investigaciones oncológicas, de desórdenes autoinmunes, aterosclerosis y enfermedad de Alzheimer^{109,110}.

La complejidad de la vía, lo altamente regulada, aunque en la mayoría de las representaciones gráficas se opta por esquematizaciones simples, da lugar a nuevas revisiones que muestren más interacciones con otras moléculas y posibles objetivos terapéuticos¹¹⁰.

El precursor primordial es acetil coenzima A (acetil-CoA), cuando la acetil-CoA se eleva en el hígado es cuando se inicia la síntesis del colesterol. Por otro lado, el colesterol es un inhibidor natural de la enzima HMG-CoA reductasa (3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA reductasa) ya que el control de ésta es el factor limitante más importante en el mecanismo general de la biosíntesis del colesterol. En presencia del colesterol la enzima no se inactiva totalmente sino solo hay menos moléculas libres en ella para catalizar la reacción por lo que si se ingiere una dieta muy rica en colesterol, el organismo formará más de él¹⁰⁹.

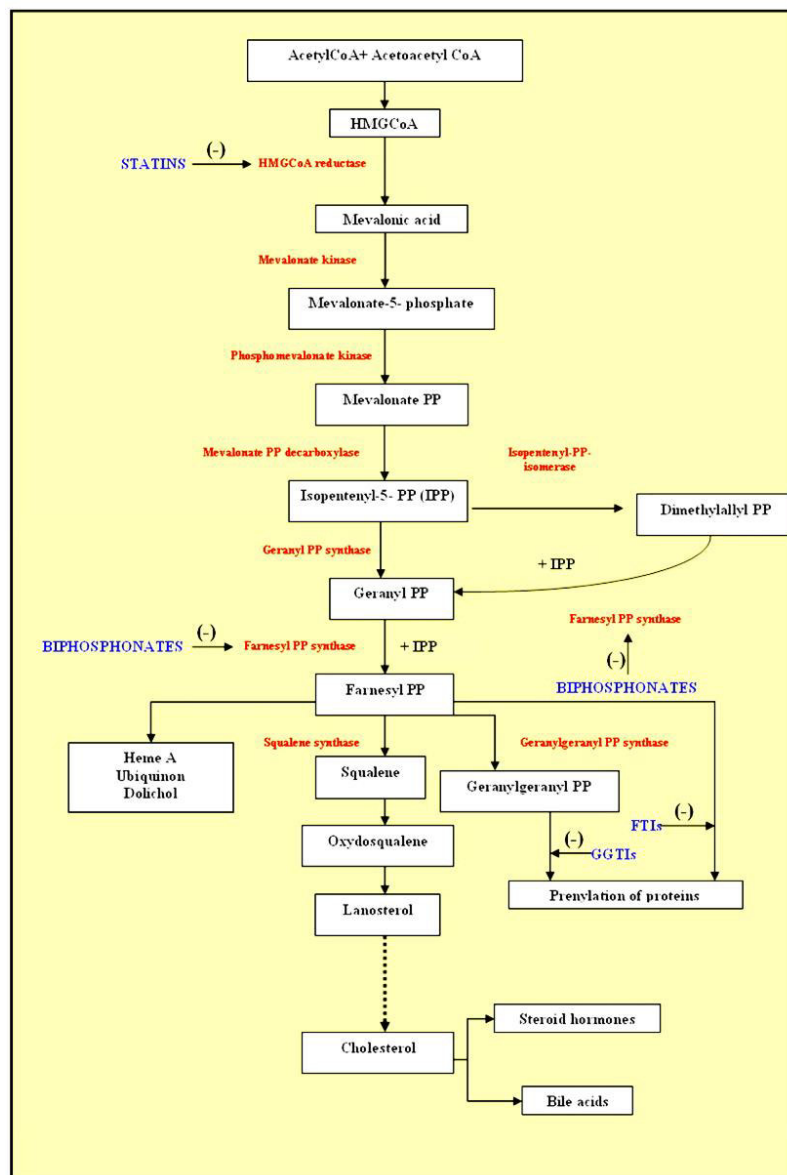


Figura N° 11. Vía del mevalonato y la síntesis de isoprenoides¹⁰⁹. PP = pirofosfato; FTIs = farnesiltransferasa inhibidores; GGTIs = geranylgeranilo transferasa inhibidores; IPP = isopentenil pirofosfato. La enzima escualeno sintasa cataliza el primer paso involucrado en la biosíntesis de colesterol hepático específico en el último punto de la ruta biosintética del colesterol, convirtiendo farnesil - pirofosfato en escualeno. El escualeno es entonces convertido después de una ciclación de dos pasos en lanosterol, el cual es convertido a colesterol después de una serie de 19 reacciones adicionales.

2.3.1.2 Triacilgliceroles

Los triacilgliceroles (TG) son ésteres de glicerol y ácidos grasos (AG), conocidos como grasas, proceden de tres fuentes principales: la alimentación, la biosíntesis del novo y la reserva existente en los adipocitos. El tejido hepático, intestinal y adiposo son los más activos en la síntesis de TG¹⁰⁴. Los TG son aislantes térmicos, se almacenan en el tejido adiposo; productores de calor metabólico, generado durante su degradación; protección mecánica, forma parte del tejido adiposo situado en la palma de la mano entre otros¹⁰⁵.

Los TG son el principal tipo de grasa transportado por el organismo, representan alrededor del 90% del aporte de lípidos de la dieta. El excesivo almacenamiento de TG en gotas de lípidos se produce cuando los niveles intracelulares de AG superan los requerimientos para los procesos celulares tales como la síntesis de la membrana, la secreción de VLDL y la producción de energía a través de β -oxidación mitocondrial¹⁰⁵. Los TG pueden ser sintetizados por la vía glicerol-3-fosfato (G-3-P) o monoacilglicerol (MG)¹⁰⁵. Ambas vías requieren acil-CoA graso como donante de acilo, que se sintetizan por acil-CoA sintetasas y utilizan diferentes conjuntos de enzima para sintetizar diacilglicerol (DG). La conversión DG a TG es catalizada por cualquier aciltransferasa acil-CoA: diacilglicerol¹¹².

El organismo digiere las grasas de los alimentos y los libera en forma de TG a la sangre, dado que son insolubles se combinan con proteínas para ser transportadas y distribuidas a través de la sangre a todo el organismo para dar energía o ser almacenada como grasa. Los productos de la hidrólisis de los TG llegan al plasma sanguíneo, en donde los AG se unen a la albúmina y una vez liberados ingresan al interior de las células para ser catabolizados en la mitocondria con la posterior formación de grandes cantidades de ATP¹⁰³. Por otro lado, la mayor parte del glicerol se capta por células hepáticas y es utilizado como precursor gluconeogénico de la glucosa¹⁰⁴. La falta de control en este proceso, en el cual la grasa se almacena en exceso respecto a la necesidad del aporte energético, se evidencia como obesidad en el ser humano. En cambio, la liberación de grasa del tejido adiposo se controla hormonalmente para satisfacer las necesidades del organismo en la

generación de energía, donde los efectos hormonales están mediados principalmente por la adrenalina en situaciones de estrés y por el glucagón durante el ayuno¹¹¹.

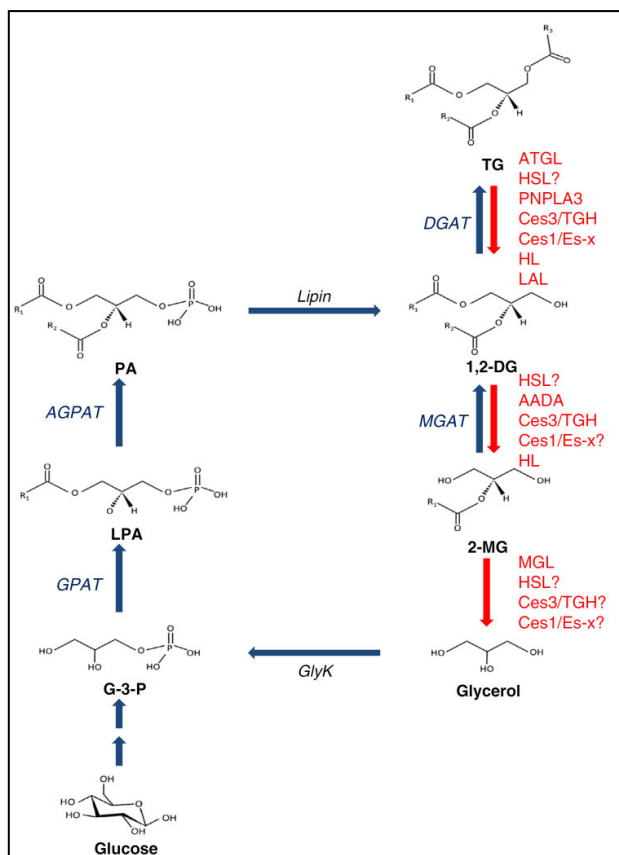


Figura N° 12. Metabolismo del triacilglicerol en hígado¹¹¹. Flechas azules (síntesis): glicerol en forma de glicerol-3-fosfato (G-3-P) para triacilglicerol (TG) se proporciona sea de la glucólisis (glucosa) o a través de la fosforilación de glicerol mediante glicerol quinasa (glyk). G-3-P es secuencialmente acilo con el ácido lisofosfatídico (LPA) y ácido fosfatídico (PA) por aciltransferasas de glicerol-3-fosfato (GPAT) y aciltransferasas acilglicerol-3-fosfato (AGPAT), respectivamente, obteniéndose el ácido fosfatídico (PA), que se convierte en 1,2-diacilglicerol (1,2-DG) a través de la eliminación de fosfato catalizada por lipinas. 1,2-DG es entonces acilado por aciltransferasas diacilglicerol (DGAT) a TG. Flechas rojas (hidrólisis): 2-monoacilglicerol (2-MG) puede ser esterificado a 1,2-DG por aciltransferasas monoacilglicerol (MGAT) y en relación con TG por DGAT. Puede ocurrir en las gotas de lípidos citosólicas por la acción secuencial de ATGL, HSL (no presente en hígado humano) y MGL. Alternativamente, TG puede ser también hidrolizado por PNPLA3 y por carboxilesterasas retículo endoplásmico-asociado (Ces), histona arilacetamida (AADA) y la lipasa hepática (HL), o en los lisosomas de la lipasa ácida lisosomal (LAL). En este diagrama simplificado sólo el sn-1,2-DG estereoisómero se representa; sin embargo, la esterificación del 2-MG por MGAT también produce la sn-2,3-DG enantiómero, que se puede convertir además a TG por DGAT. Además, la estereoespecificidad de muchas de las lipasas señaladas no se ha determinado y es posible que algunos exhiban preferencia posicional rindiendo no sólo sn-1,2-DG, pero posiblemente también sn- 2,3-DG y 1,3-DG y posteriormente sn-1-MG y/o sn-3-MG.

2.3.1.3 Lipoproteínas

Las lipoproteínas son complejos macromoleculares solubles de proteínas, lípidos, colesterol libre y esterificado, acilgliceroles y fosfolípidos, que tienen una masa molecular, tamaño, composición química, densidad y funciones fisiológicas características, siendo esenciales para el transporte de lípidos. Las lipoproteínas empaquetan los lípidos insolubles en plasma, ya sean exógenos (provenientes de los alimentos) o endógenos (sintetizados por el metabolismo), y cumplen la función de transportarlos desde el intestino y el hígado a los tejidos periféricos y viceversa para su posterior eliminación. Los lípidos no polares conforman el núcleo hidrofóbico como es el caso del colesterol esterificado y los acilgliceroles mientras que la superficie hidrofílica está compuesta por grupos lipídicos más polares como el colesterol libre y los fosfolípidos. Por otro lado solo una pequeña proporción de los ácidos grasos forman parte de las lipoproteínas, ya que la mayoría de ellos circulan unidos a la albúmina¹¹².

Los componentes proteicos, hidrosolubles, de las lipoproteínas se denominan apoproteínas, estas estabilizan la estructura de la lipoproteína permitiendo el transporte de lípidos. Se designan con letras y números: A-I, B-48, B-100, D, E, etc. Participan activamente en el metabolismo de las lipoproteínas¹¹³.

Las lipoproteínas se pueden separar por ultracentrifugación, diferencias de tamaño, movilidad electroforética y composición apoproteica. La nomenclatura más utilizada para las lipoproteínas se basa en la separación por ultracentrifugación¹¹³:

1. Quilomicrón (CM)
2. Lipoproteína de muy baja densidad (VLDL)
3. Lipoproteína de densidad media (IDL)
4. Lipoproteína de baja densidad (LDL)
5. Lipoproteína de alta densidad (HDL)

2.3.1.3.1 Quilomicrón (CM)

El CM es la lipoproteína de menor densidad. Las partículas de CM contienen apo A, Apo C, apo E (apoproteína A, C y E) y de forma característica apo B-48 (apoproteína B-48) como una proteína estructural, esta proteína en el organismo se forma exclusivamente en el intestino. Luego de la ingesta de grasa, el CM es secretado por el enterocito en el intestino quien transporta la grasa del alimento desde el intestino a los tejidos periféricos, especialmente el corazón, el músculo y el tejido adiposo. En la pared de los vasos sanguíneos de los tejidos los TG por acción de la enzima lipoproteína lipasa (LPL) penetran las células y son disgregados en sus componentes ácidos grasos y glicerol. Los remanentes de quilomicrones son captados y metabolizados por el hígado¹¹⁴.

2.3.1.3.2 Lipoproteína de muy baja densidad (VLDL)

Las VLDL presentan apo C y apo E y se caracterizan por su contenido de apoproteína B-100 (apoB-100), son sintetizadas en el hígado y desempeñan un papel comparable a los CM para los TG, transportándolos del hígado a los tejidos extrahepáticos¹¹⁴. LPL hidroliza los TG de VLDL en los capilares, reduciendo la lipoproteína a una lipoproteína de densidad intermedia (IDL)¹¹⁵. La determinación de VLDL en suero se emplea en pacientes con elevado o ligeramente altos triacilgliceroles¹¹⁶.

2.3.1.3.3 Lipoproteína de densidad media (IDL)

Las IDL son el producto del catabolismo parcial de las VLDL y son más pequeñas que sus precursoras. Por cada molécula de VLDL que se degrada, se produce una de IDL. La apo B-100 de las VLDL se transfiere a las IDL, mientras que se van perdiendo las apo C y en menor grado la apo E, a su vez se hidrolizan los TG por acción enzimática. La IDL continúa perdiendo sus acilgliceroles por LPL y lipasa hepática (HL) y su apo E hasta convertirse finalmente en LDL¹¹⁷. Tiene baja concentración en plasma y es poco estudiada en clínica aunque estudios realizados mostraron que altos niveles de IDL se asociaron con incremento de riesgo de aterosclerosis¹¹⁸.

2.3.1.3.4 Lipoproteína de baja densidad (LDL)

Las LDL tienen como proteína principal a la apo B-100 proveniente de la degradación final de la IDL en el plasma, ya que permite identificarlas por su receptor en todas las células del organismo, además son muy ricas en colesterol esterificado, y se engloba y recapta en la célula, endocitosis. Su fusión con un lisosoma produce la hidrólisis del colesterol esterificado¹¹⁹.

Está demostrado que las LDL desempeñan un papel importante en el aporte de colesterol a otros tejidos: los ésteres de colesterol que contiene son demasiado hidrófobos para atravesar por si mismos las membranas celulares transportándolos las LDL a los tejidos, aproximadamente 2/3 partes del colesterol plasmático están asociados a las LDL¹¹⁹. El factor por lo que muchas veces se lo ha denominado “colesterol malo”, habiendo señalado que tiene un importante papel en el aporte de colesterol a los tejidos, se da cuando hay demasiadas LDL en el torrente sanguíneo, relacionado directamente con la cantidad de grasa saturada y colesterol ingerido, puesto que el colesterol que transportan será depositado en las arterias, lo que puede llegar a obstruirlas y provocar infartos de miocardio¹²⁰. La reducción de grasas en la dieta reduce LDL en suero; sin embargo marcadas reducciones de LDL probadas en ensayos clínicos generaron mayor incidencia de cáncer, muerte violenta y suicida, después de haber reducido el riesgo de aterosclerosis¹²¹.

2.3.1.3.4 Lipoproteína de alta densidad (HDL)

Las HDL pueden provenir de la síntesis hepática, intestinal o del catabolismo de las lipoproteínas ricas en TG. Contrario a las LDL, las HDL se constituyen principalmente de proteínas en lugar de lípidos, contienen aproximadamente un 50% de proteínas entre apo A I y II, apo C I, II, III, algunas HDL también presentan apo E. Tienen un papel importante en el metabolismo y transporte de lipoproteínas. Su función es unirse al colesterol libre y desempeñan un papel contrario a las LDL, al eliminar colesterol de las células y transportarlo de vuelta al hígado, único órgano capaz de catabolizar y excretar eficazmente el colesterol¹²². Las HDL, adicionalmente, contienen moléculas antioxidantes que impiden que el LDL se oxide y la posterior formación de placa

aterosclerótica¹²³. Las HDL son clásicamente consideradas como lipoproteínas antiaterogénicas. Un rol antiaterogénico directo de HDL ha sido principalmente atribuido al rol que ellas juegan en el transporte reverso del colesterol por el cual el colesterol es transportado de las células extrahepáticas al hígado por excreción en la forma de sales biliares o colesterol libre¹²⁴.

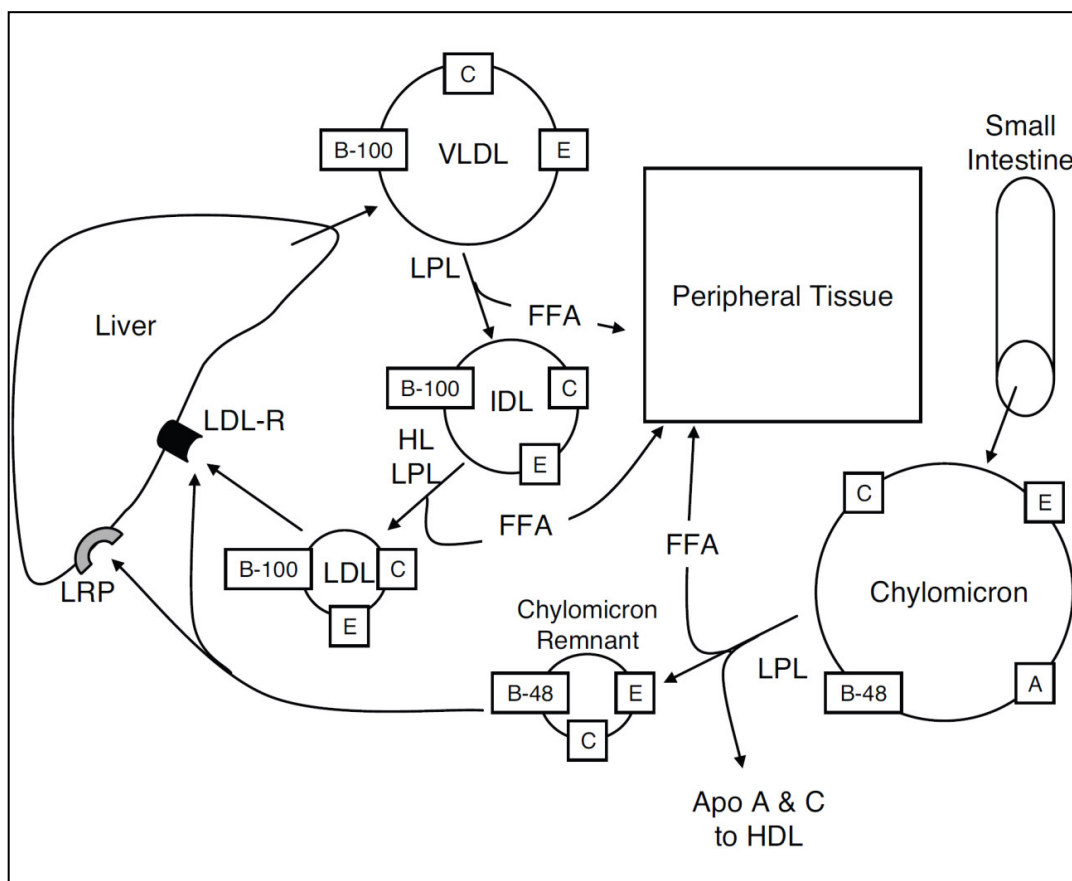


Figura N° 13: Transporte de lípidos por vía exógena¹¹⁵. Los lípidos de la dieta se secretan en el intestino delgado en los quilomicrones. Los triacilglicéridos de los quilomicrones son hidrolizados por la lipoproteína lipasa (LPL). Los ácidos grasos libres (FFA) son llevados por numerosos tejidos del cuerpo, mientras que los remanentes de quilomicrones son catabolizados principalmente en el hígado a través tanto de la lipoproteína de baja densidad (LDL), la lipoproteína de baja densidad receptor (LDL-R) y la LDL proteína relacionada (LRP) a través de reconocimiento de apolipoproteína E (apo E). Los lípidos sintetizados en el hígado se liberan del hígado, principalmente a través de lipoproteína de muy baja densidad (VLDL). LPL hidroliza los triacilglicéridos de VLDL, reduciendo la lipoproteína a una lipoproteína de densidad intermedia (IDL), que posteriormente se hidroliza por la LPL y la lipasa hepática (HL) en LDL. El catabolismo hepático de LDL se produce principalmente a través del reconocimiento de la apo B-100 por el receptor de LDL-R.

2.3.1.4 Valores normales de lípidos plasmáticos

Los valores normales de colesterol, TG, LDL y HDL son de máximo interés en el diagnóstico y tratamiento de las alteraciones de las lipoproteínas y enfermedades relacionadas. Aunque los valores de los lípidos pueden variar por factores como sexo, edad y raza, se han establecido parámetros de referencia para el riesgo de enfermedad, pronóstico o tratamiento¹²⁵.

Tabla N° 3. Riesgo y normalidad de lípidos plasmáticos¹²⁵.

Lipoproteína	Sin Riesgo (mg/dL)	Sospecha y tratamiento clínico (mg/dL)	Tratamiento (mg/dL)
Triacilgliceroles	< 150	150 - 200	> 200
Colesterol	< 220	220 - 260	> 260
LDL	< 150	150 - 190	>190

Tabla N° 4. Pronóstico según valores de HDL¹²⁵.

Lipoproteína	Sin Riesgo (mg/dL)	Sospecha y tratamiento clínico (mg/dL)	Tratamiento (mg/dL)
HDL (varones)	> 55	35 - 55	< 35
HDL (mujeres)	> 65	45 - 65	< 45

2.3.2 Dislipidemias

La dislipidemia es un término empleado para describir alteraciones de las concentraciones de lípidos plasmáticos. Estas alteraciones están relacionadas con malos hábitos en la alimentación, pero también pueden deberse a trastornos metabólicos¹²⁶.

2.3.2.1 Tipos de dislipidemias

Hay una clasificación etiopatogénica y una fenotípica también conocida como clasificación de Fredrickson¹²⁶, la más usada es la primera. Se revisa la clasificación solo para los excesos de lípido puesto que es el motivo de estudio del presente trabajo.

- **Primaria o determinada genéticamente**, la determinación de una hiperlipidemia de origen genético implica la necesidad de efectuar el estudio de trastornos lipídicos en otros miembros de la familia. Están presentes hipercolesterolemia familiar, hiperlipidemia familiar combinada, entre otras^{126,127}.
- **Secundaria o adquirida**, obedecen a influencias dependientes de uno o varios de los siguientes factores que se conocen como las cuatro “D” por sus nombres en inglés^{128,129}: Diet (dieta), Drugs (drogas), Disorders of metabolism (trastornos metabólicos), Diseases (enfermedades). Algunos ejemplos serían el alcoholismo, tabaquismo, uso de ciertos estrógenos, andrógenos, enfermedades que cursan con diabetes, colestasis, entre otras.

2.3.2.1.1 Hiperlipemias

Las hiperlipemias (HPL) pueden definirse como un exceso de las concentraciones plasmáticas de colesterol, TG o ambos a la vez denominándose hipercolesterolemias, hipertrigliceridemias o hiperlipemias mixtas, respectivamente. Las HPL no son más que la manifestación de una alteración en la síntesis y/o degradación de las lipoproteínas plasmáticas y pueden ser el reflejo de una dieta rica en grasas¹³⁰.

La importancia de las HPL en la actualidad y la razón por la que se las considera como enfermedades, radica en su conocida asociación con la aterosclerosis y la cardiopatía isquémica, principales causas de muerte en los países desarrollados y en desarrollo. Si se produce debido a una dieta rica en grasa la obesidad es una señal determinante^{129,130}.

2.3.3 Enfermedades relacionadas

2.3.3.1 Ateroesclerosis

La ateroesclerosis es un trastorno de la pared arterial y es la primera causa de mortalidad en los países occidentales industrializados¹³¹. Los monocitos sanguíneos migran hacia el subendotelio de la arteria; una vez allí, estos se convierten en macrófagos y fagocitan ésteres de colesterol procedentes de las LDL plasmáticas que se depositan en las placas ateroescleróticas, por lo general cuando estas están elevadas en sangre, convirtiéndose en células espumosas. La distorsión del subendotelio provoca una agregación de plaquetas en la superficie arterial, con lo que se liberan mitógenos procedentes de estas, como el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF)^{132,133}. Entre la placa y la arteria se comienza a producir fibrosis, endurecimiento de arterias. Conforme la placa ateroesclerótica aumenta de tamaño estrecha los vasos sanguíneos y sirve como lugar de formación de los trombos, causantes de los infartos de miocardio (ataques al corazón) y teniendo como consecuencia en muchos casos la muerte¹³¹.

Entre muchos de los factores de riesgo que pueden dar lugar a ateroesclerosis, es la obesidad uno de los factores más preocupantes ya que está relacionado en la mayoría de los casos con dieta alta en grasas.

2.3.3.1.1 Obesidad

Desde 1980, la obesidad se ha doblado en todo el mundo. En 2008, 1400 millones de adultos (de 20 y más años) tenían sobrepeso. Dentro de este grupo, más de 200 millones de hombres y cerca de 300 millones de mujeres eran obesos. El 65% de la población mundial vive en países donde el sobrepeso y la obesidad se cobran más vidas de personas que la insuficiencia ponderal. En 2013, más de 42 millones de niños menores de cinco años tenían sobrepeso. Estos datos tomados de la Organización Mundial de la Salud, quien en una nota publicada en agosto del 2014 hace notar el gran cambio que están viviendo las sociedades en el cual hasta los niños tienen sobrepeso, definida esta como la acumulación anormal o

excesiva de grasa que puede ser perjudicial para la salud y se relaciona a un índice de masa corporal de igual o superior a 25, mientras que la obesidad es igual o superior a 30¹³³.

El sobrepeso y la obesidad son el sexto factor principal de riesgo de defunción en el mundo. El 44% de la carga de diabetes, el 23% de la carga de cardiopatías isquémicas y entre el 7% y el 41% de la carga de algunos cánceres son atribuibles al sobrepeso y la obesidad¹³³. Se han realizado estudios epidemiológicos para ver el comportamiento de determinada población y poder tomar acciones correctivas y preventivas en pro de la salud de los mismos. La obesidad es considerada la pandemia del siglo XXI¹³⁴.

2.3.4 Tratamiento

2.3.4.1 Tratamiento farmacológico

2.3.4.1.2 Fármacos hipolipemiantes

Los objetivos en el manejo de las HPL varían en función del tipo de HPL y de su gravedad¹³⁵. Los fármacos empleados actualmente tienen diferentes sitios de acción en el organismo.

2.3.4.1.2.1 Inhibidores de la hidroximetilglutaril coenzima A reductasa (HMG-CoA-Reductasa): estatinas

El hígado es el sitio principal de síntesis de lipoproteínas y del catabolismo de las LDL y es el órgano diana por excelencia de las estatinas. Más de tres cuartas partes del depósito total de colesterol es de origen endógeno y de él se producen en el hígado dos tercios, a partir de HMG-CoA que se convierte en ácido mevalónico por acción de la enzima HMG-CoA-reductasa¹³⁶. Esta reacción constituye el paso limitante en la síntesis de colesterol, en consecuencia, reducen la biosíntesis intracelular hepática del colesterol y disminuyen su depósito celular^{136,137}.

La inhibición mantenida y duradera de la HMG-CoA-reductasa podría comprometer seriamente la síntesis y las funciones del colesterol presente en

las células extrahepáticas, incluida la síntesis de esteroides¹³⁶. Los inhibidores de la HMG-CoA reductasa constituyen actualmente los medicamentos de primera línea en la hipercolesterolemia. Las estatinas reducen las concentraciones de LDL hasta 60% aproximadamente, reducen modestamente los niveles de TG e incrementan HDL¹³⁸.

2.3.4.1.2.2 Resinas de intercambio iónico

Las resinas de intercambio iónico actúan a nivel del tracto intestinal, ligando ácidos biliares formados a partir de colesterol, lo que los hace no absorbibles; como consecuencia son eliminados mediante las heces. Esto altera el metabolismo del colesterol ya que debe compensar a diario la pérdida de sales biliares¹³⁹.

2.3.4.1.2.3 Fibratos o derivados del ácido fenoxiisobutírico

Estos fármacos reducen principalmente los TG del plasma y en mucho menor grado y de forma más inconstante el colesterol¹⁴⁰.

En pacientes con alto índice de TG y bajo HDL el tratamiento más adecuado es con fibratos, los que reducen los TG hasta el 50% e incrementan las concentraciones de HDL en 20%. El benzofibrato y gemfibrozilo consiguen mayores aumentos de las HDL¹⁴⁰. Se ha comprobado la capacidad litogénica que hace duplicar la incidencia de la enfermedad biliar por uso de fibratos¹⁴¹. Pueden potenciar las acciones de los anticoagulantes orales y las sulfonilureas¹⁴².

2.3.4.1.2.4 Ácido nicotínico

Es una vitamina hidrosoluble, que a dosis suprafisiológicas posee efectos vasodilatadores y actúa sobre las lipoproteínas plasmáticas. El principal efecto de NA es la inhibición parcial de la lipólisis del tejido adiposo, dando por resultado una disminución del flujo de ácidos grasos libres en el hígado reduciendo la proporción de producción de VLDL¹⁴³.

2.3.5 Tratamiento no farmacológico

2.3.5.1 Dieta

Los ensayos de intervención dietética en el manejo de las HPL se iniciaron en la década de los 60, sin embargo, mostraron efectividad y eficacia limitada. Actualmente se sabe que reducir la ingestión de calorías por debajo de las calorías consumidas está relacionado con la baja de peso y disminución de los niveles de lípidos en sangre¹⁴⁴. En general, para evitar desequilibrios la dieta debe contener aproximadamente el 40% de carbohidratos, 25 - 30% de proteínas y el 30 - 35% de grasa. Esto implica cambios en los hábitos alimentarios de la persona, con todo lo que ello puede implicar dentro de su sistema de valores, mecanismos de compensación y defensa, de rutinas y otros, por ello, la dieta se debe plantear sobre los alimentos que usualmente consume el paciente con el fin que siga las indicaciones¹⁴⁵. El apoyo psicológico es importante para no fracasar¹⁴⁶.

Las mejoras en el estilo de vida mejoran los niveles de lípidos en sangre pero no modifican, necesariamente, la mortalidad. Estudios metaanalíticos de prevención primaria usando medicamentos hipolipemiantes demuestran reducción de riesgo relativo de 30% para eventos cardíaco coronarios, se muestra entonces la necesidad de una alternativa natural eficaz¹⁴⁷.

2.3.6 Perspectivas futuras del tratamiento hiperlipídico

Siendo las causas más importantes de la falta de adherencia al tratamiento farmacológico las reacciones adversas y los altos costos de tratamiento, razón por la que se hace necesario la búsqueda de nuevos agentes de igual o mayor eficacia con mejor tolerabilidad y aceptación por el paciente, los fitofármacos constituyen una alternativa cada vez mejor aceptada¹⁴⁸. Para el caso de la obesidad, más que el tratamiento, es la prevención el objetivo que se han planteado los países del mundo hace más de una década atrás, hoy es evidente que no habido los progresos deseados. La solución se enfoca en buscar un fitofármaco que pueda ser parte de la dieta del paciente y tener eficacia comprobada y medible^{133,145}.

III. PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Materiales, equipos y reactivos

3.1.1 Material botánico

- Alga roja *Porphyra columbina* en su fase macroscópica.

3.1.2 Materiales biológicos

- Ratones albinos machos y hembras *Mus musculus*¹⁴⁹.
- Conejos albinos machos de raza Nueva Zelanda, *Oryctolagus cuniculus*¹⁵⁰.

3.1.3 Materiales de vidrio y otros

- Beaker de 1000 mL, 500 mL, 250 mL
- Varilla de vidrio
- Tela tipo tul
- Papel Kraft
- Papel filtro
- Guantes de látex
- Mascarillas 3M
- Parafilm
- Frascos de vidrio con tapa rosca
- Tubos plásticos con tapa rosca
- Tubos de precipitación marca Pirex
- Jeringas de 1 mL, 5 mL
- Aguja 21 x ½ G
- Gradillas de plástico
- Cooler
- Fiolas de 10 mL, 25 mL, 50 mL, 100 mL, 500 mL
- Micropipetas: capacidad de 10-100 uL, 100 – 1000 uL
- Micropuntas de colores: amarillas, azules

- Tubos para microcentrífugas, marca Eppendorf
- Sistema vacutainer con tubos de tapa amarilla

3.1.4 Equipos

- Balanza analítica ACCULAB SARTORIUS GROUP ALC-210.4
- Balanza digital Soehnle (capacidad de 1 g a 3 kg)
- Estufa con aire circulante Memmert UF75 Plus
- Molino de cuchillas Wiley Laboratory Mill Standar Model No.3
- Baño maría mecánico Memmert WNB-10
- Centrifugadora preparativa de sobremesa Hettich ROTOFIX 32 A
- Liofilizador Rificord LE-300-CR
- Espectrofotómetro UV-visible GENESIS TM 20
- Espectrofotómetro IR SHIMADZU IR-AFFINITY - 1
- Equipo de RMN Bruker de 300 MHz

3.1.5 Reactivos

- Agua destilada
- Cloruro de sodio 0.09 %
- Etanol 96°
- Agarosa 0.01 %
- Cloruro de bario, grado analítico
- Sulfato de sodio, grado analítico
- Formol, grado analítico
- Metanol grado HPLC
- Hielo seco
- Ácido tiobarbitúrico (ATB), grado analítico
- Ácido tricloroacético (ATC), grado analítico
- Butilhidroxitolueno (BHT), grado analítico
- Buffer fosfato salino pH 7.0 y 7.4
- Ácido clorhídrico, grado QP
- 2 - mercaptoetanol (2-ME), grado analítico

- Proteínas totales 5.9 g/dL, Wiener lab.
- Tetracloruro de carbono, grado HPLC
- Vitamina C, solución stock
- Gemfibrozilo tabletas de 600 mg, laboratorio Farminindustria
- Kit aspartato transaminasa (AST) Wiener lab
- Kit aspartato alanina aminotransferasa (ALT) Wiener lab
- Kit RANSOD, laboratorio RANDOX
- Kit Ransel, laboratorio RANDOX
- Kit Colestat *enzimático* AA, laboratorio Wiener lab.
- Kit TG Color *GPO/PAP* AA, Wiener lab.
- Kit HDL Colesterol FT, Wiener lab.

3.2 Recolección y selección del alga

El alga *Porphyra columbina* fue colectada en el litoral peruano, en la zona de Barranco, en el mes de julio del 2013 y llevada al Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos para su respectiva clasificación taxonómica (Anexo II).

En fase macroscópica, la fase de interés del presente estudio, el alga no presenta diferenciación sexual estando presente en su talo los gametos femeninos y masculinos por lo cual siendo la muestra homogénea no se tomó en consideración algún otro criterio de selección²⁴.

3.3 Obtención del polisacárido del alga

3.3.1 Determinación de humedad

Las algas clasificadas, seleccionadas y lavadas fueron desecadas en estufa con aire circulante a 40 °C de temperatura. Transcurrida las primeras 12 horas, se efectuó una primera pesada, 12 horas después una segunda pesada y luego cada hora hasta peso constante. El contenido de humedad se determinó gravimétricamente, se empleó el método indirecto por volatilización¹⁵¹.

3.3.2 Extracción y purificación del polisacárido

Las algas fueron molidas y la extracción se realizó con 50 g de algas en polvo pesadas en beaker por duplicado y numeradas para poder ser identificadas, tratadas con agua destilada y sometidas a extracción en caliente por 60 minutos a 80 °C con agitación constante²⁶. Durante el proceso de extracción los extractos obtenidos se identificaron como E1 (extracto obtenido del beaker 1) y E2 (extracto obtenido del beaker 2).

El total de extracciones fueron cinco en ambos casos y los volúmenes de filtrado fueron similares para las muestras. Se descartó el residuo y la mezcla se filtró usando lienzo fino estéril, tipo tul. La extracción final se delimitó al agregar etanol 96° en proporción 1:3 filtrado - etanol, a 10 mL del filtrado de la quinta extracción, previamente centrifugado para eliminar impurezas, y corroborar que la obtención de polisacárido fue mínima por lo cual no se consideró una sexta extracción.

Tabla N° 5. Volúmenes filtrados del extracto de *Porphyra columbina*.

Extracto	Volumen filtrado (mL)	
	E1	E2
Primera	490	510
Segunda	495	510
Tercera	315	325
Cuarta	290	310
Quinta	294	307

Los extractos obtenidos de las extracciones consecutivas se juntaron en un beaker, se centrifugaron para eliminar impurezas, se concentraron en caliente y se procedió al tratamiento con etanol 96° para obtener el polisacárido. Para colectar el polisacárido total obtenido de la fase alcohol-agua que lo contenía, incluido el que se obtuvo de los 10 mL retirados inicialmente para determinar la extracción final, se empleó la separación por centrifugación. Se juntaron los precipitados, el polisacárido, y se almacenó el sobrenadante alcohol-agua para recuperar posteriormente el etanol.

Seguido a ello se realizó la purificación del polisacárido por tratamiento con etanol 96° con el objetivo de eliminar impurezas. Con este fin se redisolvió el polisacárido en agua destilada y se añadió 3 volúmenes de etanol 96°, se realizaron dos procesos de purificación (Figura N° 15).

3.3.3 Liofilización

El polisacárido fue disuelto en agua destilada y la solución fue deshidratada por liofilización. Esta operación se realizó en los laboratorios de la Facultad de Química e Ingeniería Química de la UNMSM a través de su Unidad de Servicios de Análisis Químicos y Fisicoquímicos (USAQ).

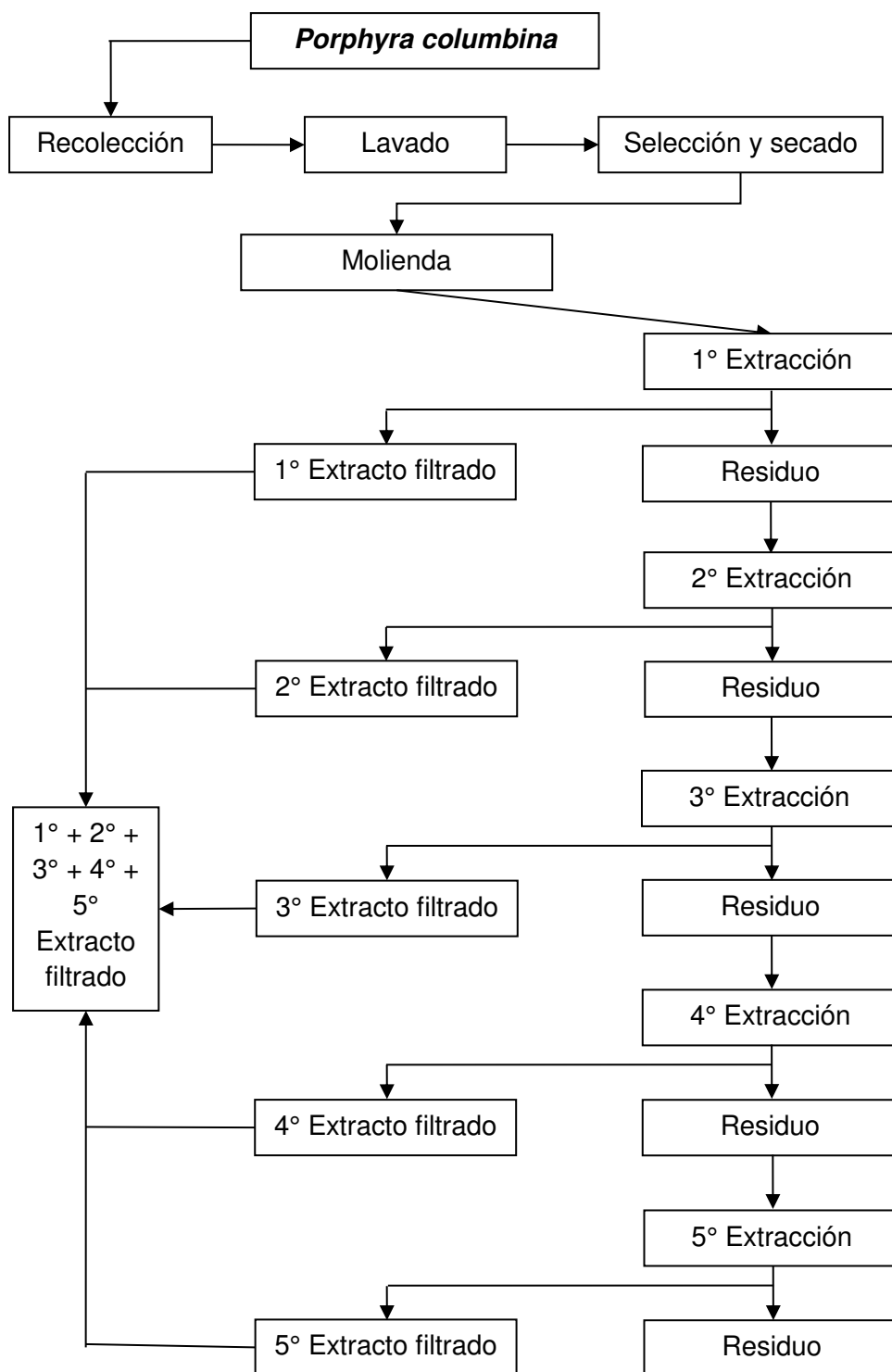


Figura N° 14. Diagrama de flujo de la extracción acuosa del porfirano de *Porphyra columbina*.

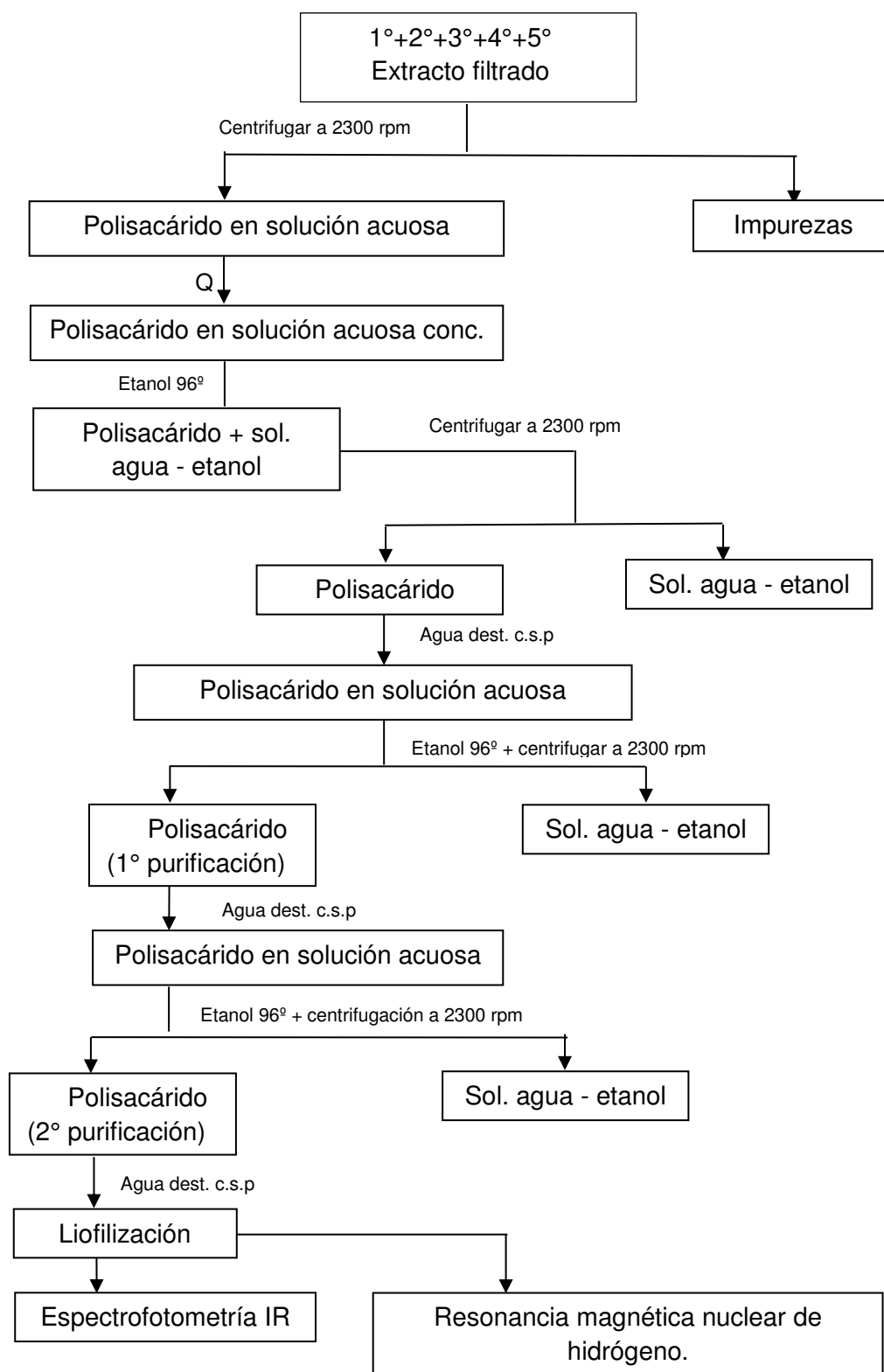


Figura N° 15. Diagrama de flujo de la purificación, liofilización y análisis instrumental del porfirano.

3.3.4 Análisis de unidad monomérica y grupo sulfato

3.3.4.1 Análisis cuantitativo de 3,6-anhidrogalactosa

Para cuantificar el contenido de 3,6-anhidrogalactosa se empleó el método colorimétrico de Yaphe¹⁵².

Fundamento: el ácido clorhídrico reacciona con el polisacárido hidrolizándolo, luego el monosacárido que ha perdido una molécula de agua reacciona con el resorcinol formándose un compuesto de coloración rojizo.

Procedimiento: se midió 2 mL de estándar de 3,6-anhidrogalactosa (3,6-AG) en concentración 9.2 µg/mL y 2 mL de polisacárido en solución acuosa a concentración de 80 µg/mL, los cuales fueron transferidos a sendos tubos de ensayo. Se colocaron en un baño de hielo, se añadió 10 mL de solución de resorcinol 10 % en ácido clorhídrico 12 M, luego se mezclaron y colocaron en baño maría a 80 °C por 10 minutos, se retiraron los tubos y se enfriaron por 2 minutos. El blanco, 2 mL de agua destilada más 10 mL de resorcinol al 10 % paso por el mismo proceso que los dos tubos.

La absorbancia fue leída a 550 nm.

La concentración de 3,6-AG en la muestra se calculó empleando la siguiente fórmula:

$$C_x = \frac{A_m}{A_{AG}} \times C_{AG} \times 0.89$$

C_x = Concentración de 3,6-AG en muestra

A_m = Absorbancia de 3,6-AG en muestra

A_{AG} = Absorbancia de 3,6-AG estándar

C_{AG} = Concentración de 3,6-AG estándar

3.3.4.2 Análisis cuantitativo de sulfato

Para cuantificar el contenido de sulfato se empleó el método turbidimétrico de Jackson y McCandless¹⁵³.

Fundamento: en medio ácido y calor se rompen los enlaces glicosídicos y los sulfatos se liberan a un medio adecuado en el cual se encuentra el precipitante, generándose turbidez la cual es medida por espectrofotometría.

Procedimiento: se prepararon los reactivos agarosa 0.01 % al que se le añadió 0.5 g de cloruro de bario. Así mismo se preparó ácido tricloroacético al 8 %. Las distintas concentraciones de sulfato a 20, 40, 60, 80 y 120 µg/mL se prepararon a partir de una solución de 200 µg de SO_4^{2-} /mL.

Se prepararon las muestras a cuantificar. Para la hidrólisis del polisacárido se procedió de la siguiente forma¹⁵⁴: los 10 mg de polisacáridos anteriormente pesados se colocaron en una ampolla estéril, se agregó 2.9 mL HCl 2 N, se cerró con calor en mechero bunsen y se colocó en estufa por 72 horas a 70 °C luego de lo cual se retiró de la estufa y se abrió la ampolla. Los hidrolizados fueron filtrados y diluidos. Se midió 1.1 mL de filtrado diluido.

Tabla N° 6. Medición de sulfato.

Reactivo	Tubos (mL)		
	S	M	B
Solución de sulfato	1.1	-	-
Hidrolizado de polisacárido	-	1.1	-
ATC 8 %	1.2	1.2	1.2
Agarosa 0.01 %	0.6	0.6	0.6
Mezclar y dejar reposar x 40´			
Agitar			
Leer a 500 nm			

S = solución de sulfato preparada

M = muestra de polisacárido

B = blanco

Los resultados finales se expresan en porcentaje de sulfato por peso seco de alga.

3.3.5 Análisis por espectroscopia infrarroja (IR)

El polisacárido liofilizado fue analizado mediante espectroscopia de infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR) usando la técnica por ATR, a números de onda de 4000 cm^{-1} a 650 cm^{-1} y de 1200 cm^{-1} a 800 cm^{-1} en los laboratorios de USAQ, con el objetivo de poder apreciar los grupos funcionales característicos de los porfiranos y el éster sulfato principalmente.

La muestra liofilizada se empleó directamente en el análisis sin ningún tratamiento previo.

3.3.6 Análisis por Resonancia Magnética Nuclear (RMN- ^1H)

La preparación de la muestra y el respectivo análisis se realizó en el laboratorio de Resonancia Magnética Nuclear perteneciente a la Sección de Química de la Pontificia Universidad Católica del Perú.

Se colocaron 10 mg del polisacárido en un vial y se agregó 700 μL de agua deuterizada. Se cerró y agitó suavemente el vial en agitador vórtex hasta disolución. La muestra se leyó en el equipo de RMN para determinación de sus hidrógenos.

3.4 Estudio farmacológico

3.4.1 Ensayo de toxicidad

3.4.1.1 Ensayo de toxicidad aguda oral

Se realiza el ensayo con el fin de determinar la dosis letal media (DL50).

Método Operatorio

Para el diseño y desarrollo del experimento se consideraron las normas OECD^{155, 156, 157}.

Se emplearon 30 ratones albinos hembras *Mus musculus*, las cuales tenían 8 semanas de edad y pesaban de 34 ± 2 gramos. Tuvieron un periodo previo de adaptación al ambiente de 15 días, conforme a la guía del INS¹⁴⁹, la misma que se siguió en todo el desarrollo del experimento.

Los animales fueron alimentados con dieta comercial adquirida del INS, agua *ad libitum* y mantenidos a una temperatura de $22 \pm 2^\circ\text{C}$ con ciclos de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad en el bioterio de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

Se formaron 5 grupos de 6 ratones cada uno, la elección fue al azar. Los grupos se dividieron de la siguiente forma:

GC: grupo control

GP5: grupo dosificado con polisacárido a 5 mg/kg

GP50: grupo dosificado con polisacárido a 50 mg/kg

GP300: grupo dosificado con polisacárido a 300 mg/kg

GP2000: grupo dosificado con polisacárido a 2000 mg/kg

Antes de la dosificación se consideró en cuanto al alimento y el agua para los ratones: no tomar agua ni ingerir alimentos 4 horas antes de la dosificación.

Se realizó el pesado de animales y la preparación de las soluciones a administrar una hora antes de realizarse la dosificación que fue única. Los

animales se marcaron de forma tal que pudieron ser reconocidos individualmente en su observación posterior. Se consideró las marcas cabeza, lomo y cola, rojo y negro en cada grupo.

La concentración madre de polisacárido fue de 22 mg/mL, solución saturada que fue la máxima que se pudo alcanzar debido a la naturaleza de la muestra, viscosa, y motivo de que no se consideraran concentraciones mayores a 2000 mg/kg ya que tendría que habersele administrado al animal vía oral en 3 o más ocasiones, lo cual no iría de acuerdo con las recomendaciones de la OECD.

La administración se realizó haciendo uso de una jeringa y sonda metálica, la cual se introduce a través de la cavidad oral y el esófago hasta llegar al estómago del animal donde se depositó el polisacárido. La temperatura de la muestra fue alrededor de los 37 °C. Al grupo GC se le administró agua destilada en todos los casos.

Luego de la administración, día uno, se observó a los animales por una hora, no se proveyó alimento ni agua hasta después de pasadas 2 horas momento en el que se realizó una segunda observación y a las cuatro horas de la administración se realizó una tercera observación.

Las observaciones en los días siguientes se hicieron dos veces al día, mañana y tarde, hasta el día catorce que se dió por concluido el experimento. Durante el ensayo se evaluó la mortalidad, el perfil de comportamiento (irritabilidad, sedación), el perfil autonómico (salivación, contorsión abdominal, emesis). También se controló la evolución del peso corporal, tomando registros en forma interdiaria.

El último día de observación, no se presentaron efectos tóxicos por lo cual se sacrificaron a todos los animales por dislocación cervical. Se realizó la necropsia grosera de todos los animales sacrificados.

3.4.1.2 Ensayo de toxicidad oral dosis repetida

Método Operatorio

Para el diseño y desarrollo del experimento se consideraron las normas OECD^{157,158}.

Se emplearon 18 ratones albinos hembras *Mus musculus*, las cuales tenían 8 semanas de edad y pesaban de 30 ± 2 gramos. Tuvieron un periodo previo de adaptación al ambiente de 15 días, conforme a la “Guía de manejo y cuidado de animales de laboratorio: ratón” del INS¹⁴⁹, la misma que se siguió en todo el desarrollo del experimento.

Los animales fueron alimentados con dieta comercial adquirida del INS, agua *ad libitum* y mantenidos a una temperatura de 22 ± 2 °C con ciclos de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad en el bioterio de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

Se formaron 3 grupos de 6 ratones cada uno, la elección fue al azar. Los grupos se dividieron de la siguiente forma:

GC: grupo blanco

GP18: grupo dosificado con polisacárido a 18 mg/kg

GP50: grupo dosificado con polisacárido a 50 mg/kg

El grupo GC solo recibió agua destilada cada día por 28 días, en tanto los grupos GP18 y GP50 recibieron las dosis respectivas de polisacárido cada día por 28 días, con la consideración en ambos casos de 5 mL/kg de peso.

Se realizó la preparación de las soluciones de polisacárido de forma diaria poco antes de realizarse la administración todos los días a la misma hora de la mañana y después de registrar los pesos. Se consideró una solución de 2 mg/mL para GP18 y 15 mg/mL para GP50 a partir de las cuales se realizaron los cálculos para la dosificación considerando el peso de cada individuo.

Los animales se marcaron de forma tal que pudieron ser reconocidos individualmente para su observación durante el tratamiento que duró 28 días.

Se consideró las marcas de número de líneas de colores rojo y negro en las colas para GP18 y GP50 respectivamente.

La administración se realizó haciendo uso de una jeringa y sonda metálica la cual se introduce a través de la cavidad oral y el esófago hasta llegar al estómago del animal donde se depositó el agua destilada o polisacárido según correspondiera. La temperatura de la muestra fue alrededor de los 37 °C en el momento de la administración.

Después de la administración, se observó a los animales por media hora, luego a las 4 horas y los días siguientes una vez al día durante una hora, hasta el día veintiocho que se dio por concluido el experimento. Durante el ensayo se evaluó la mortalidad, el perfil de comportamiento (irritabilidad, sedación), el perfil autonómico (salivación, contorsión abdominal, emesis). También se controló la evolución del peso corporal, tomando registros en forma interdiaria.

El último día de observación, no se presentaron efectos tóxicos por lo cual se da por concluido el ensayo y se sacrifican a todos los animales por dislocación cervical.

Se realizó la necropsia grosera de todos los animales sacrificados y los hígados fueron separados y lavados en solución salina al 0.09% para luego realizar el corte de la misma región de cada lóbulo derecho del hígado de ratón, región media (se forma un cubo de cerca de 0.5 cm por lado), y fue fijado en solución de formol al 10 %¹⁵⁹.

Las muestras de tejido hepático fueron llevadas al Instituto de Patología del Hospital Arzobispo Loayza, donde se realizó la observación microscópica e interpretación de los resultados.

3.4.2 Capacidad antioxidante *in vivo*

Los ratones machos adultos se obtuvieron del instituto Nacional de Salud. Todos los animales se mantuvieron en jaulas y separados en grupos. Bajo las condiciones de 22 ± 2 °C, una humedad relativa del 65 % y ciclos de 12 horas de luz/oscuridad, se les permitió el acceso libre a comida adquirida del INS y agua. Todos los experimentos se realizaron siguiendo lo establecido en la guía del INS para el trabajo con animales¹⁴⁹.

Tratamiento

Un total de 42 ratones fueron divididos en seis grupos al azar, de 7 ratones cada uno, como sigue:

GCN: grupo control normal

GCM: grupo control modelo de CCl₄

GCV: grupo control de vitamina C 25mg/kg de peso corporal

P625: grupo inyectado con CCl₄ después de dosis dependiente de porfirano 6,25 mg/kg de peso corporal

P2500: grupo inyectado con CCl₄ después de dosis dependiente de porfirano 25 mg/kg de peso corporal

P5000: grupo inyectado con CCl₄ después de dosis dependiente de porfirano 50 mg/kg de peso corporal

Los ratones de todos los grupos recibieron administración por vía intraperitoneal de los siguientes compuestos como sigue: los ratones en el grupo GCN y GCM se les inyectó cloruro de sodio 0.09 % a concentración de 5 mL/kg de peso corporal por día; los ratones en GCV fueron inyectados con vitamina C 25 mg/kg de peso corporal cada día y los ratones de los grupos P625, P2500 y P5000 con las tres dosis diferentes de polisacárido disueltas en cloruro de sodio 0.09 % según corresponde y descrito líneas arriba considerando 5 mL/kg de peso corporal por día como volumen de administración.

Después de 7 días de tratamiento, una solución de aceite de oliva extra virgen al 2% de tetracloruro de carbono (CCl_4) se inyectó por vía intraperitoneal en cada grupo en una dosis de 5 mL/kg de peso corporal, excepto para GCN, al que le fue administrado una inyección por la misma vía conteniendo solamente aceite de oliva y en la misma dosis (5 mL/kg de peso corporal)⁴². Luego de ello, los ratones no ingirieron nada salvo agua que estuvo a su disposición en todo momento y después de 24 horas, los seis grupos de ratones fueron pesados y sacrificados por dislocación cervical.

Las muestras de sangre se obtuvieron por punción cardiaca. Se realizaron las necropsias en todos los animales, que incluía evaluación macroscópica e histopatológica (observación microscópica).

Después del sacrificio, los hígados enteros se lavaron en solución salina al 0.09%, se tomaron y registraron los pesos y la misma parte de cada lóbulo derecho, región media, del hígado de ratón fue separado (se forma un cubo de cerca de 0.5 cm por lado) y fue fijado en solución de formol al 10%¹²³. Las muestras de tejido hepático en formol fueron llevados al Laboratorio de Patología del Hospital Arzobispo Loayza, donde se realizó la observación microscópica e interpretación.

Se centrifugaron las muestras de sangre a 3000 rpm durante 10 min para obtener las muestras de suero, a continuación se almacenó a 4 °C hasta su utilización, que no excedió las 24 horas después del almacenamiento.

El hígado lavado, y después de tomarse la muestra histológica, fue homogenizado con el fin de obtener las muestras idóneas que permitieran realizar los ensayos de SOD, CAT, GPx y MDA. Se siguió el esquema presentado en la Figura N° 16.

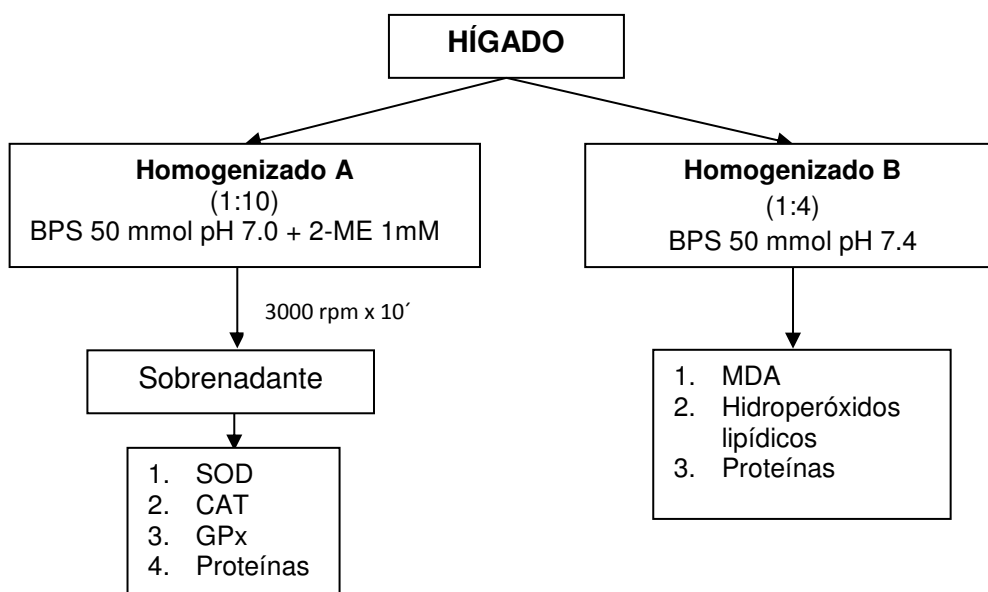


Figura N° 16. Esquema metodológico de tratamiento del hígado de ratón¹⁶⁰.

3.4.2.1 Cálculo del Índice de hígado

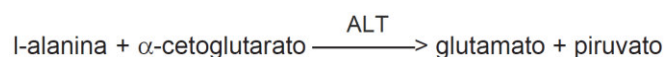
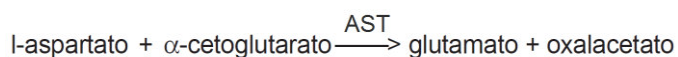
Guo T⁴² y Zhang Q¹⁶¹ emplean el parámetro índice de hígado, y generalizado como índice de tejido, para tener una estimación del efecto protector o tóxico que tuvo una sustancia en determinado tejido. Se calculó de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\text{Peso del hígado de ratón} / \text{Peso del ratón} \times 100\%$$

3.4.2.2 Medición de transaminasas (AST: aspartato aminotransferasa y ALT: alanina aminotransferasa) en suero

Se llevó a cabo la medición de AST y ALT según indica el kit de transaminasas 200 del laboratorio Wiener lab. Éste método se basa en la metodología propuesta por Reitman y Frankel¹⁶².

Fundamento: el oxalato formado es inestable y se transforma en piruvato, el cual reacciona con la 2,4-dinitrofenilhidracina produciéndose, en medio alcalino, un compuesto coloreado que se mide a 505 nm. Este fundamento se aplica para ambas enzimas y se puede visualizar en las reacciones siguientes:



Procedimiento: primero se realizó la curva de calibración y luego la determinación para las muestras de suero tanto de AST como ALT. Las condiciones en el espectrofotómetro fueron las mismas.

Condiciones de la prueba en el espectrofotómetro UV-visible:

Longitud de onda: 505 nm

Cubeta: 1 cm, material de cuarzo

Temperatura: 37 °C

Para realizar la curva de calibración se agregaron a 9 tubos para la prueba de AST y 9 tubos para la prueba de ALT los volúmenes de estándar y reactivo A (AST o ALT) que se indica a continuación:

Tabla N° 7. Volúmenes de reactivos para curva de calibración AST y ALT.

Tubo	Estándar (mL)	Reactivo A (mL)	Agua dest. (mL)	ALT (U/L)	AST (U/L)
1	0,00	1,00	0,2	-	-
2	0,05	0,95	0,2	9	7
3	0,10	0,90	0,2	18	12
4	0,15	0,85	0,2	25	20
5	0,20	0,80	0,2	37	28
6	0,25	0,75	0,2	46	37
7	0,30	0,70	0,2	56	48
8	0,40	0,60	0,2	79	81
9	0,50	0,50	0,2	113	-

Luego de lo cual se procedió para cada tubo como sigue:

Tabla N° 8. Procedimiento de curva de calibración para AST y ALT.

Reactivo	Tubo Reactivo
Estándar + Reactivo A	1,2 mL
Reactivo B	1 mL
Mezclar	
Incubar x 10 min a 37 °C	
Reactivo C con intervalo de 30'	10 mL
Reposo x 10 min	
Leer a 505 nm	

Una vez que se obtuvieron los datos de la curva de calibración, y mostrando correlación, a mayor concentración mayor absorbancia, se procedió a la determinación de las enzimas en las muestras.

Tabla N° 9. Determinación de AST y ALT.

Reactivo	Blanco	Muestra
Reactivo A (AST o ALT)	0,25 mL	0,25 mL
Colocar en baño maria a 37 °C unos minutos		
Suero	-	100 µL
Agua destilada	100 µL	-
Mezclar por agitación suave e incubar exactamente 30 minutos		
Reactivo B	0,25 mL	0,25 mL
Mezclar. Dejar 10 minutos a 37 °C		
Reactivo C diluido	2.5 mL	2.5 mL
Mezclar por inversión, retirar del baño. Enfriar x 2 min		
Leer a 505 nm*		

* La coloración de la reacción es estable durante 30 minutos.

Tanto para la curva de calibración y la determinación de las transaminasas en suero, los reactivos empleados son los siguientes:

Reactivo A: l-aspartato 100 mM + α -cetoglutarato 2 mM (para AST); l-alanina 100 mM + α -cetoglutarato 2 mM (para ALT). Ambos en tampón fosfato 100 mM pH 7.4.

Reactivo B: 2,4-dinitrofenilhidracina (2,4-DNFH) 1 mmol en HCl 1 mol/L.

Reactivo C: solución de hidróxido de sodio 4 mol/L.

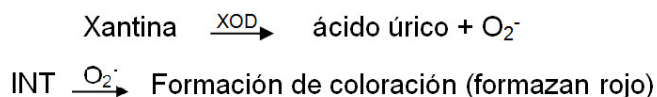
Estándar: piruvato de sodio 2 mmol/L.

3.4.2.3 Medición de los productos de la peroxidación lipídica

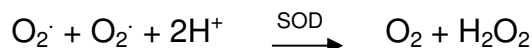
3.4.2.3.1 Medición de la superóxido dismutasa (SOD)

Se lleva a cabo la medición de SOD según el método colorimétrico descrito por Woolliams y Wiener¹⁶³ que es el que se indica en el kit RANSOD del laboratorio RANDOX.

Fundamento: se emplea xantina oxidasa (XOD) para generar radicales superóxido los que reaccionan con cloruro de 2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenol)-5-feniltetrazolium (INT) para formar una coloración roja. La actividad de la superóxido dismutasa es medida por el grado de inhibición de esta reacción. Una unidad de SOD es la que causa una inhibición de un 50% de la proporción de reducción de INT bajo las condiciones del ensayo.



Reacción química:



Procedimiento

Condiciones de la prueba en el espectrofotómetro UV-visible:

Longitud de onda: 505 nm

Cubeta: 1 cm

Temperatura: 37 °C

Tabla N° 10. Determinación de superóxido dismutasa (SOD).

Reactivo	Muestra	Blanco	Estándar
Sobrenadante del homogenizado A diluido al 50%	25 µL	-	-
Diluyente RANSOD	-	25 µL	-
Solución estándar	-	-	25 µL
Mezcla reactiva RANSOD	850 µL	850 µL	850 µL
Mezclar bien			
Xantina oxidasa	100 µL	100 µL	100 µL
Leer a 505 nm, la primera lectura 30' después de realizada la mezcla y la segunda lectura 3 min después de la primera			

El sobrenadante se diluyó al 50% en tampón fosfato salino (BPS) 0.01 mol/L pH 7.0 que es el que indica el kit como diluyente RANSOD no provisto dentro del kit por lo cual se preparó previamente a su uso en la prueba. Para la condición de temperatura a 37 °C, se ponen las muestras en baño maría antes de agregar la xantina oxidasa.

Los cálculos son realizados considerando el cambio de absorbancia por minuto ($\Delta\text{Abs}/\text{min}$) del blanco como el 100% de actividad.

Fórmula:

$$\%INH = 100 - \frac{\Delta\text{AbsMuestra}/\text{min} \times 100}{\Delta\text{AbsBlanco}/\text{min}}$$

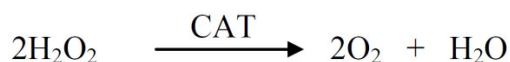
El porcentaje de inhibición de la muestra fue relacionada con la del estándar, para determinar la actividad de la SOD en U/L.

Para la determinación de proteínas se tomó 50 µL de la dilución del sobrenadante del homogenizado A, empleado en la medición de la SOD, se mezcló con 1 mL de reactivo Bradford y se leyó a 595 nm. La actividad de SOD fue expresada en U/mg Prot.

3.4.2.3.2 Medición de la actividad de la catalasa (CAT)

Se sigue el método descrito por Aebi⁷⁷.

Fundamento: la CAT cataliza la descomposición del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en oxígeno y agua. Medida por espectrofotometría UV a 240 nm.



Procedimiento

Condiciones de la prueba en el espectrofotómetro:

Longitud de onda: 240 nm

Cubeta: 1 cm, material de cuarzo

Temperatura: 37 °C

Tabla N° 11. Determinación de catalasa (CAT).

Reactivo	Muestra	Blanco
Sobrenadante (homogenizado A)	0.1 mL	-
H_2O_2 0.05%	2.9 mL	2.9 mL
Buffer fosfato salino 50 mM pH 7.0	-	0.1 mL
Leer en el espectrofotómetro a 240 nm cada 15" x 2 min.		

El peróxido de hidrógeno se preparó a partir de una solución de 10 volúmenes en BPS pH 7.4. Tanto el peróxido de hidrógeno como los tampones fosfato salino fueron preparados el mismo día en que se realizó la prueba.

Los cálculos se realizaron tomando el valor de la diferencia de absorbancia por minuto de la muestra con el blanco ($\Delta\text{Abs}/\text{min}$) y el coeficiente de extinción molar para el H_2O_2 a 240 nm ($4.0 \text{ M}^{-1}\text{c}^{-1}$).

La actividad de CAT fue expresada como actividad específica (Umg/Prot).

Fórmula:

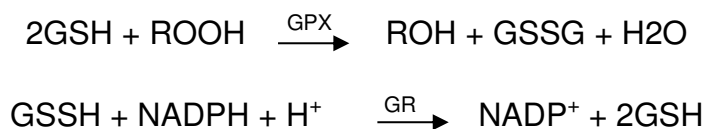
$$U / mgProt = \frac{\Delta Abs / min}{mgProt / mL} \times 7500$$

3.4.2.3.3 Medición de la glutatión peroxidasa (GPx)

Se lleva a cabo la medición de GPx según se indica en el kit RANSEL del laboratorio RANDOX basado en el método colorimétrico de Plagia y Valentine¹⁶⁴.

Fundamento: la glutatión peroxidasa (GPx) cataliza la oxidación de glutatión (GSH) por hidroperóxido de cumeno. En la presencia de glutatión reductasa (GR) y NAPH, la glutatión oxidada (GSSG) es inmediatamente convertida a la forma reducida con una oxidación concomitante de NADPH a NADP⁺. El decrecimiento de la absorbancia se mide a 340 nm.

Principales reacciones químicas:



Procedimiento

Condiciones de la prueba en el espectrofotómetro:

Longitud de onda: 340 nm

Cubeta: 1 cm

Temperatura: 37 °C

Tabla N° 12. Determinación de glutatión peroxidasa (GPx).

Reactivo	Muestra	Blanco
Sobrenadante (homogenizado)	10 µL	-
Agua destilada	-	10 µL
Mezcla RAMSEL	500 µL	500 µL
Hidroperóxido de cumeno	20 µL	20 µL
Leer al espectrofotómetro a una absorbancia de 340 nm al 1, 2, 3 min		

Para los cálculos se tomó el valor de la diferencia de absorbancia por minuto de la muestra con el blanco ($\Delta Abs/min$) y el coeficiente de extinción molar para el NADPH a 340 nm ($6.22 \times 10^{-4} M^{-1}cm^{-1}$).

Para la determinación de proteínas de GPx se utilizó 10 uL de sobrenadante del homogenizado A, se mezcló con 1 mL de reactivo Bradford y se leyó a 595 nm.

Fórmula:

$$U/gProt = \frac{\Delta Abs/min}{mgProt/ml} \times 4340.836$$

3.4.2.3.4 Medición de malondialdehído (MDA)

Se sigue el método descrito por Buege y Aust¹⁶⁵.

Fundamento: en la muestra se encuentra malondialdehído libre y unido a proteínas. El hidróxido de sodio concentrado precipita las proteínas y permite medir el malondialdehído total.

Procedimiento

Condiciones de la prueba en el espectrofotómetro:

Longitud de onda: 240 nm

Cubeta: 1 cm, material de cuarzo

Temperatura: 37 °C

Tabla N° 13. Determinación de malondialdehído (MDA).

Reactivo	Muestra	Blanco
BPS 50nmol pH 7.4	-	500 µL
Homogenizado	500 µL	500 µL
BHT 0.2%	50 µL	50 µL
NaOH 12.5 N	20 µL	20 µL
Incubar en baño de agua a 60°C por 30 min		
ATC 10% 4°C	1500 µL	1500 µL
Reposo de 10 min en congelación		
Centrifugar a 3000 rpm por 10 min		
Sobrenadante	1000 µL	1000 µL
Ácido tiobarbitúrico 0.6%	500 µL	500 µL
Incubar a 95°C por 45 min		
Centrifugar a 3000 rpm por 10 min		
Lectura del sobrenadante a 532 nm		

Los cálculos se realizaron tomando el valor de la diferencia de absorbancia de la muestra y el blanco (ΔAbs) y el valor del coeficiente de extinción ($1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) del MDA a 532 nm.

Fórmula:

$$\mu\text{molMDA} / \text{mgProt} = \frac{\Delta Abs}{\text{mgProt} / \text{mL}} \times 38.4615$$

3.4.2.4 Determinación de proteínas

Se empleó el método de Bradford¹⁶⁶.

Fundamento: se forma un complejo con el reactivo azul brillante de Coomassie G-250 y las proteínas en solución, causando un cambio en el máximo de absorbancia a 595 nm.

Procedimiento: para la preparación del reactivo de Bradford se disolvió 100 mg del reactivo azul brillante de Coomassie G-250 en 50 mL de etanol al 95%, se añadió 100 mL de ácido ortofosfórico al 85% y se completó con agua bidestilada c.s.p. 1 litro. Se dejó en reposo por 24 horas en un frasco ámbar y se filtró con papel filtro.

Para la realización de la curva de calibración se parte de una muestra estándar (5.9 g/dL) de proteínas totales, con un volumen de 33.9 μ L el cual se diluyó en una fiola de 100 mL, obteniendo una concentración de 20 μ g/mL a partir de la cual se realizaron las diluciones sucesivas para obtener las demás concentraciones.

Tabla N° 14. Curva de calibración de proteínas.

Tubo	Concentración	Volumen de Patrón	Volumen de Bradford
1	0.5	50 μ L	1 mL
2	1	50 μ L	1 mL
3	2.5	50 μ L	1 mL
4	5	50 μ L	1 mL
5	10	50 μ L	1 mL
6	20	50 μ L	1 mL

3.4.3 Capacidad Hipolipemiente

Los conejos albinos machos, de raza Nueva Zelanda, con pesos entre 1900 a 2100 gramos, provenientes de la Veterinaria Ferrer, quienes desde el destete fueron alimentados con conejina R, agua *ad libitum* y mantenidos en ambientes adecuados, permanecieron en el bioterio del Departamento de Farmacología de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la UNMSM durante todo el transcurso del experimento.

Al momento de su llegada al bioterio, fueron revisados por el veterinario Richard Montero quien comprobó el buen estado físico de los animales y fue el responsable de la toma de muestras de sangre así como observó y brindó recomendaciones del micro y macroambiente en el que permanecieron los animales durante todo el estudio. El estudio se llevó a cabo acorde a la Guía de manejo y cuidado de animales de laboratorio: conejo del INS¹⁵⁰.

3.4.3.1 Preparación de las sustancias a emplear en el tratamiento

Preparación de la dieta hiperlipídica

Se realizó un homogenizado conformado por cerebro cocido de res que contiene 3.1% de colesterol¹⁶⁷ y aceite de maíz, vehículo, en proporción 1:1 (Anexo III).

Preparación de la muestra en estudio

Fue preparada a partir de porfirano liofilizado, se disolvió con agua destilada a 45 °C en cantidad suficiente para obtener una solución de concentración al 3,77 mg/mL.

Preparación del estándar: Gemfibrozilo

Se tomó en consideración que la dosis recomendada de gemfibrozilo es de 1200 mg por día y el peso promedio de una persona es 70 kg¹⁶⁸. Se determinó el peso medio de los conejos del grupo GG y en base a este peso se estableció la dosis por día de tratamiento. Las tabletas conteniendo 600 mg de gemfibrozilo fueron trituradas en un mortero, el polvo resultante fue distribuido

en 14 chártulas cuyo peso era equivalente de 186 mg del principio activo en cada una. Posteriormente fueron colocados en un desecador. Por cada día de administración se colocó el contenido de una chártula en una fiola de 50 mL de capacidad y se enrasó con agua destilada. En cada administración se agitó antes de usar.

3.4.3.2 Tratamiento

Se formaron 4 grupos al azar de 5 animales cada uno, los cuales después de dos semanas de adaptación al ambiente en donde se realizaría el estudio, recibieron por 21 días consecutivos el siguiente tratamiento empleando la vía oral:

GC (control normal): dieta normal (100 mg de conejina R + agua *ad libitum*)

GH (control de lipemia): dieta normal + 10 mL de dieta hiperlipídica

GG (grupo gemfibrozilo): dieta normal + 10 mL de dieta hiperlipídica + Tratamiento con estándar (10 mL de gemfibrozilo 17.14 mg/kg x día)

GP (grupo polisacárido): dieta normal + 10 mL de dieta hiperlipídica + tratamiento con polisacárido (10 mL de porfirano 17.14 mg/kg x día)

Después de la primera semana, día 1 a 7, de dieta hiperlipídica para todos los grupos salvo el GC, se trata con gemfibrozilo al grupo GG y porfirano al grupo GP hasta el último día de estudio en tanto el grupo GH continuó con la dieta normal y la dieta hiperlipídica hasta el día 21. Se realizaron 4 extracciones de sangre, en los días 1, 8, 15 y 22 considerando el día uno como basal pues la muestra se tomó antes de aplicar el tratamiento, igual consideración recibió el registro de pesos para el día 1. En todos los casos se realizó en horas de la mañana. El tratamiento y extracción por grupo se muestra en la tabla N° 15. El programa de administración diario por grupo se muestra en el anexo N° IV.

Tabla N° 15. Tratamientos y extracción de sangre en conejos.

GRUPO EXPERIMENTAL	Días de tratamiento con control de peso																						
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	
	Días de extracción de sangre																						
	B	SEMANA 1						I	SEMANA 2						M	SEMANA 3						F	
GC (Grupo control)	DIETA NORMAL																						
GH (Grupo control de lipemia)	DIETA NORMAL + DIETA HIPERLIPÍDICA																						
GG (Grupo gemfibrozilo)	DIETA NORMAL + DIETA HIPERLIPÍDICA																						
								Gemfibrozilo 17.14 mg/kg															
GP (Grupo polisacárido)	DIETA NORMAL + DIETA HIPERLIPÍDICA																						
								Porfirano 17.14 mg/kg															

B: toma de muestra sanguínea basal (día 1), I: extracción de sangre al inicio (día 8), M: extracción de sangre a la mitad (día 15) y F: extracción de sangre al final (día 22) del tratamiento con gemfibrozilo y polisacárido.

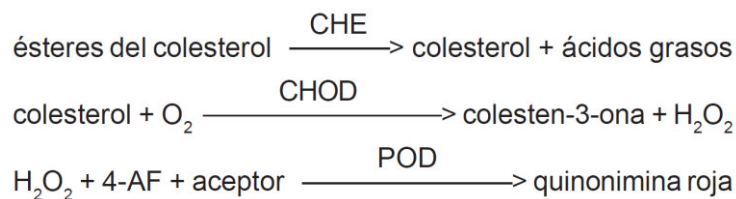
3.4.3.3 Evaluación Bioquímica

La muestra a evaluar fue suero de sangre de conejo obtenida de la vena marginal, de la oreja del animal. Para la toma se usa el sistema Vacutainer, empleando tubos de tapa amarilla con gel separador. Se determinó lípidos en suero sanguíneo (perfil lipídico): colesterol, triacilgliceroles, HDL, LDL y se calculó el VLDL.

3.4.3.3.1 Determinación de colesterol (C)

Se emplea el kit Colestat *enzimático* AA. Este kit se fundamenta en una adaptación del método de Abell LL y Levy BB¹⁶⁹.

Fundamento: la enzima éster hidrolasa (CEH) libera los ésteres del colesterol, produciendo colesterol libre y ácidos grasos. El colesterol libre por acción de una segunda enzima, la enzima colesterol oxidasa (CHOD), se oxida liberando peróxido de hidrógeno, éste peróxido de hidrógeno en presencia de enzima peroxidasa (POP) reacciona con el sistema cromogénico, 4-aminofenazona (4-AF), dando origen a una quinonimina roja.



Procedimiento

Condiciones en el espectrofotómetro:

Longitud de onda: 505 nm

Cubeta: 1 cm

Temperatura: 37 °C

Tabla N° 16. Determinación del colesterol total en suero.

Reactivo	Tubo B	Tubo S	Tubo D
Estándar	-	10 uL	-
Muestra	-	-	10 uL
Blanco	1 mL	1 mL	1 mL

Se incuba 5 minutos en baño de agua a 37 °C, luego se retira y se lee en el espectrofotómetro.

Para los cálculos se determina el factor en miligramos por decilitro (mg/dL) y así se expresan los resultados.

Fórmulas:

Factor = $200/\text{Abs}_{\text{st}}$ mg/dL
Colesterol total (mg/dL) = Factor x $\text{Abs}_{\text{Muestra}}$

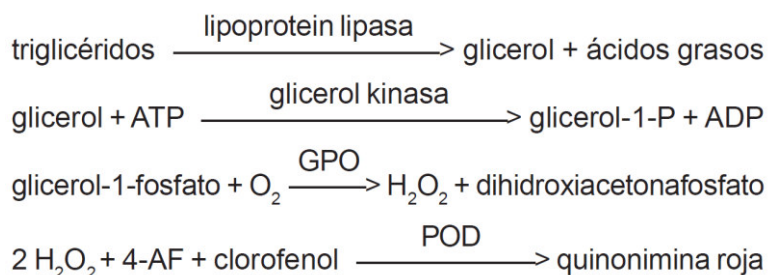
Abs_{st} = absorbancia del estándar

$\text{Abs}_{\text{Muestra}}$ = absorbancia de la muestra

3.4.3.3.2 Determinación de triacilgliceroles (TG)

Se emplea el kit TG Color *GPO/PAP AA*. Es una adaptación del método de Fossati¹⁷⁰.

Fundamento: los triacilgliceroles se hidrolizan con la enzima lipasa específica y se libera ácidos grasos y glicerol. La enzima glicerolquinasa (GK) fosforila el glicerol y posteriormente, el glicerol-1-fosfato es oxidado por una tercera enzima la glicerol-fosfato oxidasa (GPO), generándose peróxido de hidrógeno. Este peróxido de hidrógeno al reaccionar con la 4-aminofenazona y el clorofenol, reacción catalizada por la enzima peroxidasa (POD), da un compuesto coloreado, la quinonimina roja.



Procedimiento

Condiciones en el espectrofotómetro:

Longitud de onda: 505 nm

Cubeta: 1 cm

Temperatura: 37 °C

Tabla N° 17. Determinación de triacilgliceroles en suero.

Reactivo	Tubo B	Tubo S	Tubo D
Estándar	-	10 uL	-
Muestra	-	-	10 uL
Blanco	1 mL	1 mL	1 mL

Se incuba 5 minutos en baño de agua a 37 °C, luego se retira y se lee en el espectrofotómetro. Para los cálculos se determina el factor en miligramos por decilitro (mg/dL) y así se expresan los resultados.

Fórmulas:

$\text{Factor} = 200/\text{Abs}_{\text{st}} \text{ mg/dL}$
$\text{Triacilglicerolos (mg/dL)} = \text{Factor} \times \text{Abs}_{\text{Muestra}}$

Abs_{st} = absorbancia del estándar

$\text{Abs}_{\text{Muestra}}$ = absorbancia de la muestra

3.4.3.3 Determinación de HDL

Se emplea el kit HDL colesterol FT, cuyo fundamento es una adaptación de Castelli y Levitas¹⁷¹.

Fundamento: las HDL se separan precipitando selectivamente las lipoproteínas de baja y muy baja densidad (LDL y VLDL) mediante el agregado de ácido fosfotúngstico en presencia de iones magnesio. Las HDL quedan en el sobrenadante separado por centrifugación, donde se realiza la determinación del colesterol ligado a las mismas, empleando el sistema enzimático colesterol oxidasa/peroxidasa con colorimetría según Trinder (fenol/4-AF).

Procedimiento

Condiciones en el espectrofotómetro:

Longitud de onda: 505 nm

Cubeta: 1 cm

Temperatura: 37 °C

En tubos de precipitación se midió 200 µL de muestra y se agregó 500 µL de reactivo A (reactivo precipitante). Se homogenizó por agitación durante un tiempo aproximado de 20 segundos y se dejó 10 minutos en reposo a temperatura ambiente. Luego se centrifugó a 3000 r.p.m por 15 minutos. El sobrenadante, límpido, se empleó como muestra.

Tabla N° 18. Determinación de HDL en suero.

Reactivo	Tubo B	Tubo S	Tubo D
Sobrenadante	-	-	200 uL
Estándar	-	20 uL	-
Reactivo de trabajo	2 mL	2 mL	2 mL

*El reactivo de trabajo es Colestat enzimático AA/líquida

Se incuba 5 minutos en baño de agua a 37 °C, luego se retira y se lee en el espectrofotómetro.

Para los cálculos se determina el factor en miligramos por decilitro (mg/dL) y así se expresan los resultados.

Fórmulas:

Factor = $76,2 / \text{Abs}_{\text{st}}$ mg/dL
HDL (mg/dL) = Factor x $\text{Abs}_{\text{Muestra}}$

Abs_{st} = absorbancia del estándar

$\text{Abs}_{\text{Muestra}}$ = absorbancia de la muestra

3.4.3.3.4 Determinación de LDL

Se determinó el LDL aplicando la fórmula de Friedewald¹⁷².

$\text{LDL} = \text{CT} - \text{HDL} - \frac{\text{TG}}{5}$

3.4.3.3.5 Determinación de VLDL

Se determinó considerando la fórmula de Friedewald¹⁷².

$$\text{VLDL} = \frac{\text{TG}}{5}$$

3.4.5 Análisis de datos

Los resultados fueron evaluados mediante el programa estadístico SPSS versión 19. En los resultados se reporta la Media y desviación estándar (S.D.) Se empleó la prueba de ANOVA y Tukey para probar las diferencias entre grupos. Se consideró significativo $p < 0.05$, en caso de no encontrarse diferencias se consideró $p < 0.01$.

IV. RESULTADOS

4.1 Obtención del polisacárido del alga

4.1.1 Determinación de humedad

El peso del alga fresca fue de 1122 gramos. El peso final, después de la desecación en estufa, fue de 189.62 gramos. El contenido de alga en la muestra fue de 16.9 % y el contenido de humedad de 83.1 %.

4.1.2 Extracción, purificación y liofilización del polisacárido

Después de realizada la extracción, purificación y liofilización se calculó el rendimiento tomando en consideración los gramos de alga en polvo empleados versus los gramos obtenidos después de la liofilización.

Los gramos de polisacárido empleado fueron 100 y los gramos resultantes de liofilización fueron 14.9. El rendimiento fue de 14.9%.

4.1.3 Análisis de unidad monomérica y grupo sulfato

4.1.3.1 Análisis cuantitativo de 3,6-anhidrogalactosa

Se aplicó la fórmula correspondiente para realizar los cálculos:

$$Cx = \frac{0.215}{0.195} \times 18.4 \times 0.89 = 18.055 \text{ ug/2 mL}$$

Como en la muestra se empleó una solución 160 ug en 2 mL como estándar, el porcentaje de 3,6-AG en la muestra es de 11.28%.

4.1.3.2 Análisis cuantitativo de sulfato

Tabla N° 19. Curva de calibración de sulfatos.

Concentración	Absorbancia
20	0.056
40	0.120
60	0.172
80	0.220
100	0.280

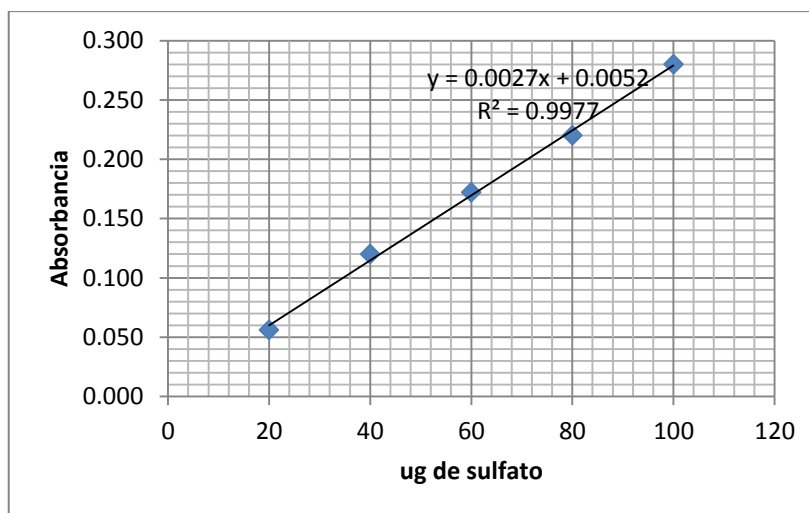


Figura N° 17. Curva de calibración de sulfatos.

La muestra dio una absorbancia de 0.042 y la concentración determinada aplicando la ecuación de la recta resultante de la curva de calibración fue de 15.56%.

4.1.4 Análisis por espectroscopia infrarroja (IR)

Los espectros IR del polisacárido nativo (Figura N° 18 y N° 19) presentan números de onda entre 4000 cm^{-1} a 650 cm^{-1} y 1200 cm^{-1} a 800 cm^{-1} que caracterizan los siguientes grupos funcionales:

La banda a 3319.49 cm^{-1} indica presencia de grupos hidroxilo.

La banda a 1215.15 cm^{-1} evidencia S=O de éster sulfato por vibración de tensión asimétrica a ese número de onda.

La banda a 931.62 cm^{-1} identifica C-O de 3,6-anhidrogalactosa.

La banda a 889.18 cm^{-1} se le atribuye a β -D-galactosa no sulfatada.

La banda a 815.89 cm^{-1} , identifica C-O-SO₃ en C6 de galactosa. El éster sulfato está unido a grupo hidroxilo primario en residuos L-galactosa-6-sulfato que son unidades precursoras del 3,6-anhidrogalactosa.

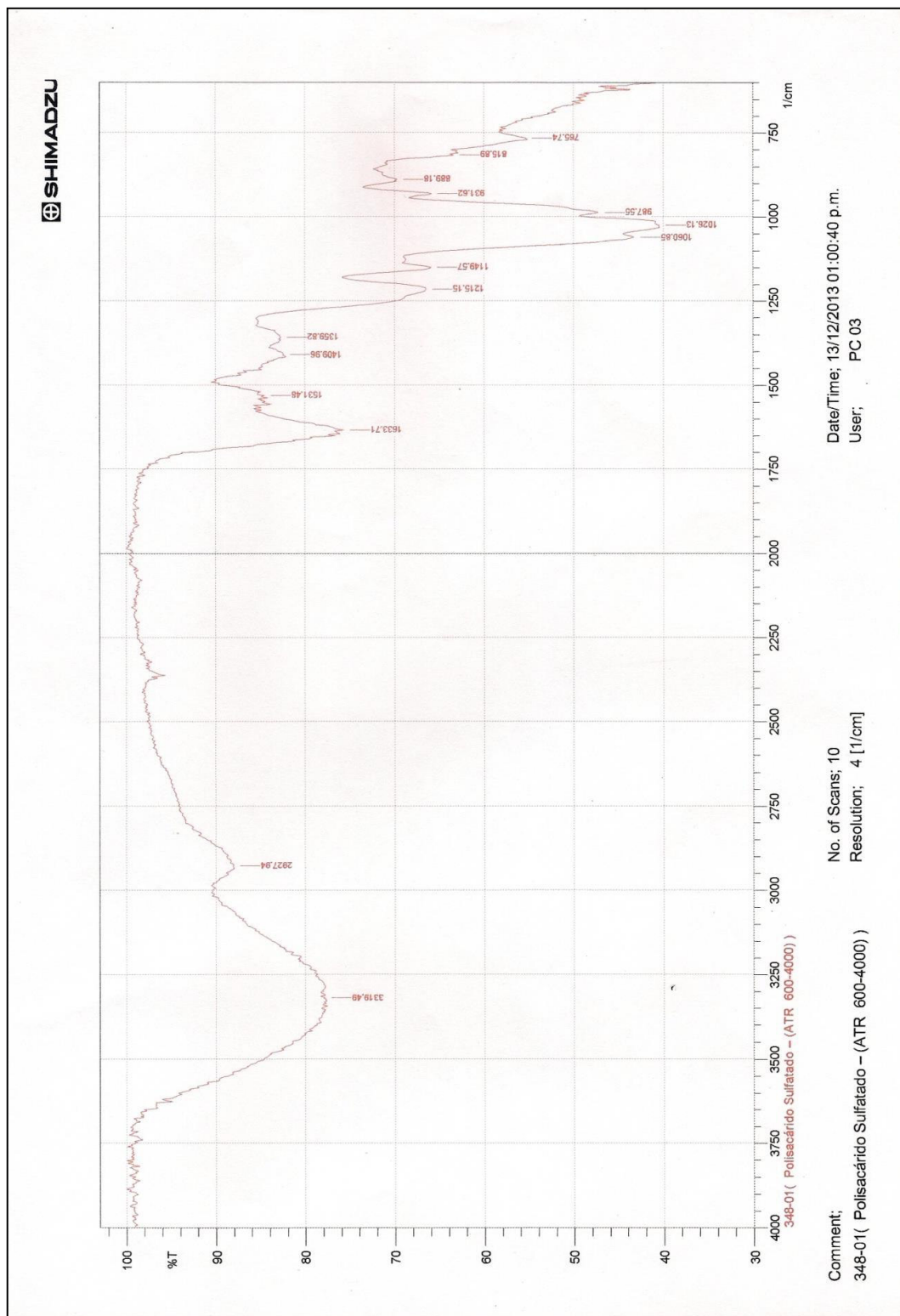


Figura N° 18. Espectro Infrarrojo del porfirano (4000 cm^{-1} a 750 cm^{-1}) de *Porphyra columbina*.

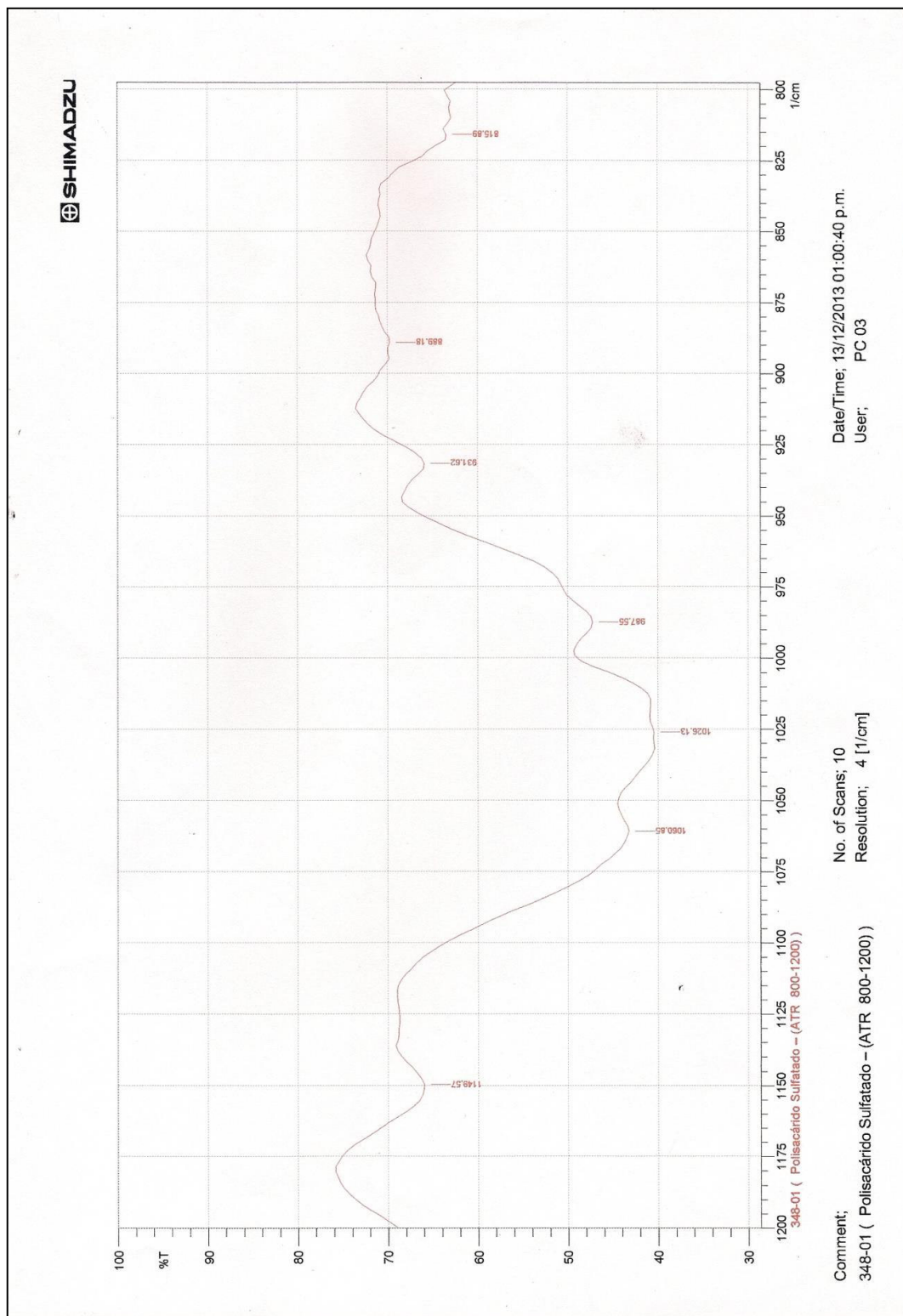


Figura N° 19. Espectro infrarrojo del porfirano (1200 cm^{-1} a 800 cm^{-1}) de *Porphyra columbina*.

4.1.5 Análisis por Resonancia Magnética Nuclear (RMN- ^1H)

El espectro de la resonancia magnética nuclear de hidrógeno (RMN- ^1H) (Figura N° 20), mostró los siguientes resultados:

La señal a 5.161 ppm se le atribuyó al protón anomérico de las unidades 4-*O*- α -L-galactosa-6-sulfato precursoras de 3,6-anhidro- α -L-galactosa.

La señal a 5.035 ppm se identificó como perteneciente al protón anomérico de las unidades 3,6- anhidro- α -L-galactosa.

Las señales por debajo del rango de 5.161 ppm a 5.035 ppm se identificaron como grupos metilo donde por ejemplo:

La señal a 3.646 ppm identifica al grupo metilo de 2-*O*-metil- β -D-galactosa.

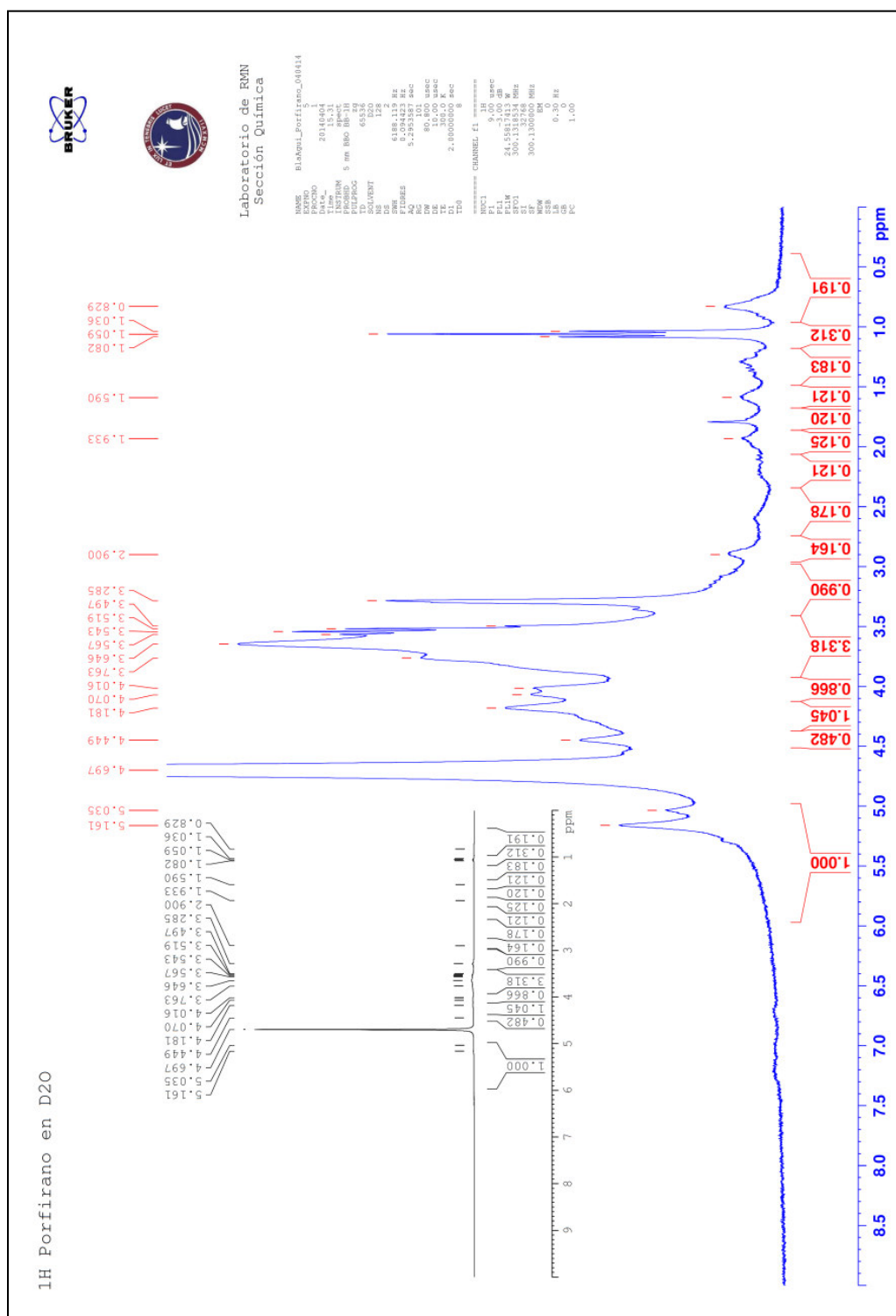


Figura N° 20. Espectro de RMN-¹H del polisacárido (porfirano) de *Porphyrha columbina*.

4.2 Estudio Farmacológico

4.2.1 Ensayo de toxicidad

4.2.1.1 Ensayo de toxicidad aguda oral

No se registraron síntomas de intoxicación para los puntos de observación experimentales comparados con el grupo control. Se registraron los pesos de forma interdiaria.

Tabla N° 20. Medias de los pesos de ratones. Toxicidad aguda oral.

Día	Control		5 mg/kg		50 mg/kg		300 mg/kg		2000 mg/kg	
	\bar{X}	D.S.	\bar{X}	D.S.	\bar{X}	D.S.	\bar{X}	D.S.	\bar{X}	D.S.
1	34,2	0,8	33,7	0,7	34,3	0,6	35,7	0,2	35,3	0,5
3	34,2	0,8	33,8	0,6	34,2	0,6	33,8	0,5	33,7	0,6
5	35,2	0,8	33,8	0,6	34,3	0,5	34,3	0,5	33,0	0,4
7	35,7	1,0	34,0	0,6	34,5	0,5	34,5	0,3	33,2	0,3
9	35,7	1,0	34,3	0,4	34,7	0,6	34,8	0,4	33,7	0,2
11	36,5	0,8	34,2	0,5	35,2	0,5	35,3	0,3	34,3	0,3
13	36,8	1,0	34,3	0,7	35,3	0,6	35,8	0,4	34,8	0,5
15	37,0	1,1	34,7	0,6	35,7	0,7	36,2	0,5	35,7	0,4

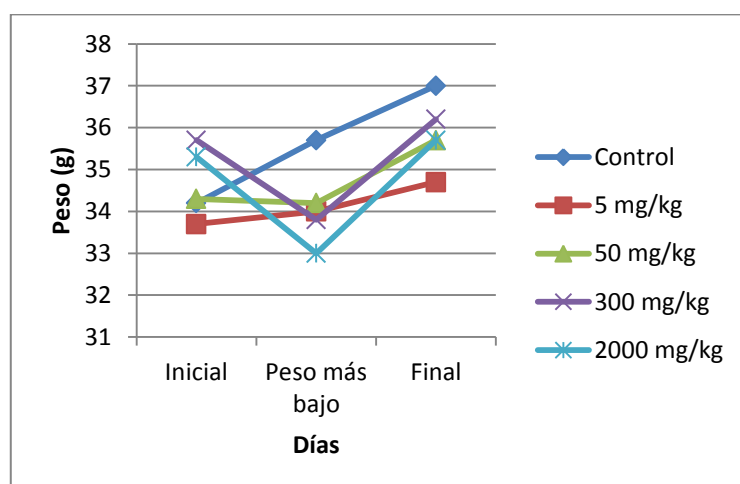


Figura N° 21. Comportamiento del peso de los ratones. No se mostraron diferencias significativas a $p < 0.05$ ni $p < 0.01$.

El peso más bajo en todos los grupos se reportó la primera semana, los días 3, 5 o 7. En el gráfico se observa que la media más baja registrada fue para el grupo 2000 mg/kg. No hay diferencia significativa entre grupos a $p < 0.01$.

4.2.1.2 Ensayo de toxicidad oral dosis repetida (TODR)

No se registraron síntomas de intoxicación para los puntos de observación experimentales comparados con el grupo control. Se registraron los pesos de forma interdiaria.

Tabla N° 21. Medias de los pesos de ratones para TODR.

	Control		18 mg/kg		50 mg/kg	
	\bar{X}	D.S.	\bar{X}	D.S.	\bar{X}	D.S.
Semana 0	29,2	0,7	29,0	0,7	28,8	0,3
Semana 1	30,0	0,7	30,2	0,8	29,0	0,3
Semana 2	31,3	0,7	31,0	0,7	29,5	0,2
Semana 3	32,7	0,6	32,3	0,7	30,5	0,2
Semana 4	34,3	0,6	33,9	0,7	30,2 ^a	0,2

^a significativo para $p < 0.05$ comparado con el grupo control

Los tejidos hepáticos mostraron daño solo para la dosis de 50 mg/kg

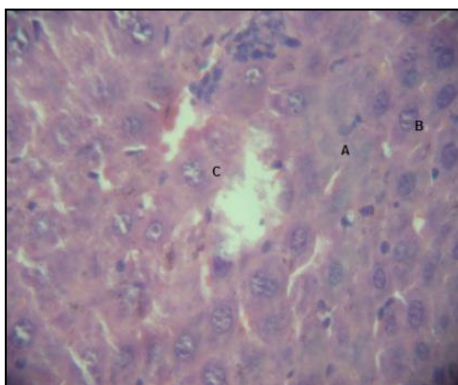


Figura N° 22. Tejido hepático de ratón (dosis = 50 mg/kg). A = congestión de los canales. B = núcleos pulverulentos. C = citoplasma opaco por coagulación.

4.2.2 Capacidad antioxidante *in vivo*

El segundo día de administración se encontró un ratón muerto perteneciente al grupo P5000, la necropsia no mostró daño de órganos. Por lo cual los resultados pertenecen a 41 muestras.

4.2.2.1 Cálculo del Índice de hígado

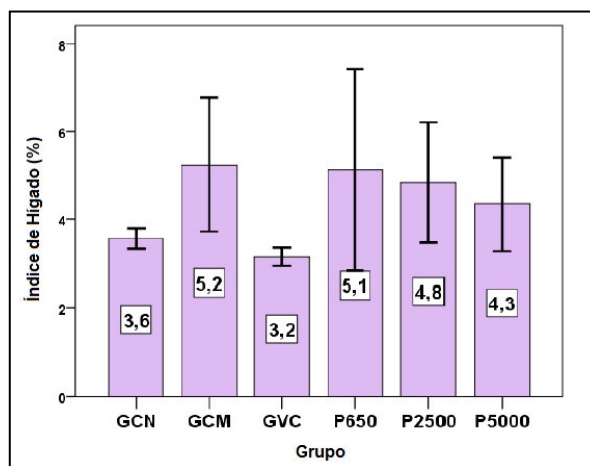


Figura N° 23. Medias estimadas de Índice de hígado. No se mostraron diferencias significativas a $p < 0.05$ ni $p < 0.01$.

4.2.2.2 Medición de transaminasas en suero

4.2.2.2.1 Medición de AST (aspartato aminotransferasa)

La muestra 1 para la curva de calibración se lee como blanco.

Tabla N° 22. Curva de calibración de AST.

Tubo	Absorbancia	Actividad AST
Muestra 2	7	0.067
Muestra 3	12	0.117
Muestra 4	20	0.165
Muestra 5	28	0.255
Muestra 6	37	0.298
Muestra 7	48	0.345
Muestra 8	81	0.452
Muestra 9	0	0.551

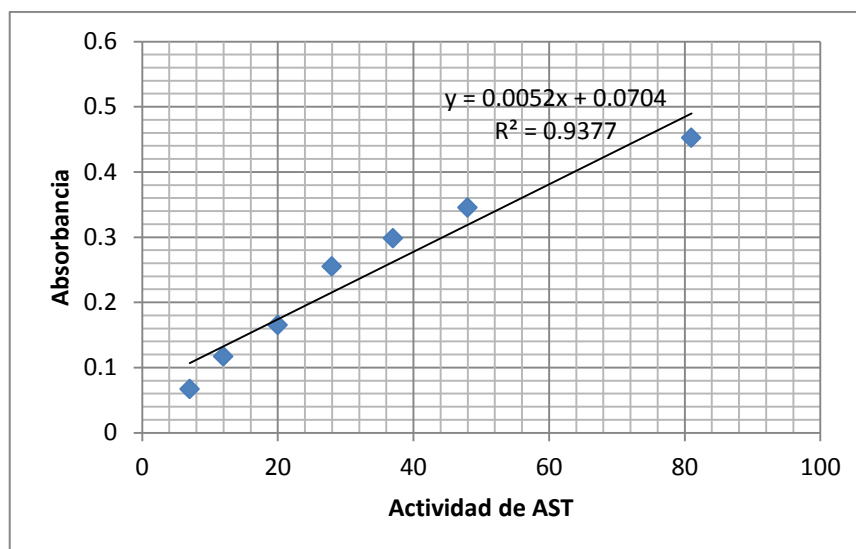


Figura N° 24. Curva de calibración AST.

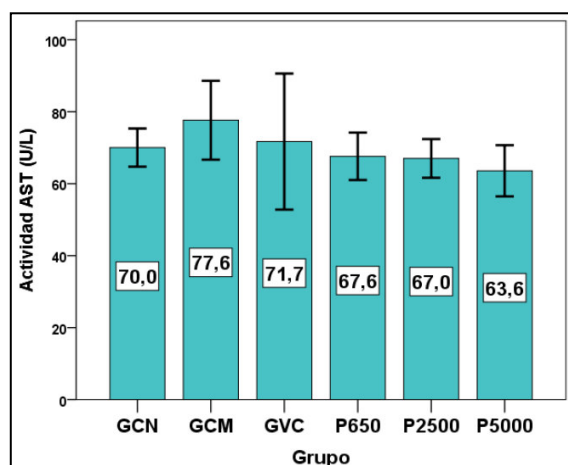


Figura N° 25. Medias estimadas de AST. Hay diferencia significativa para $p < 0.01$ entre el grupo GCM y GCN.

4.3.2.2.2 Medición de ALT (alanina aminotransferasa)

Se registraron las absorbancias, la muestra 1 se leyó como blanco, se determinó la actividad de cada muestra y se graficó la curva de calibración para determinar la ecuación de la recta para ALT:

Tabla N° 23. Curva de calibración de ALT.

Tubo	Abs	Actividad ALT
Muestra 2	0.063	9
Muestra 3	0.124	18
Muestra 4	0.142	25
Muestra 5	0.198	37
Muestra 6	0.256	46
Muestra 7	0.292	56
Muestra 9	0.451	79

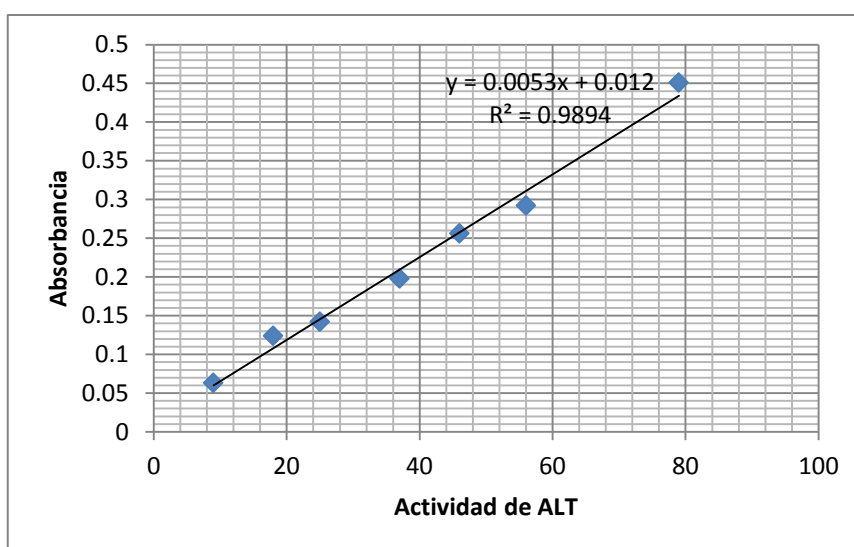


Figura N° 26. Curva de calibración ALT.

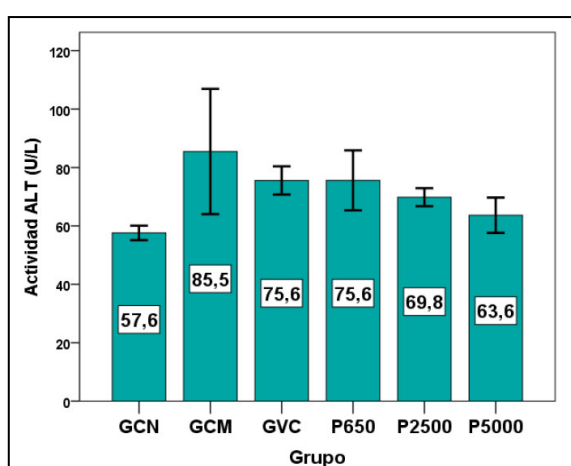


Figura N° 27. Medias estimadas de ALT. Hay diferencia significativa para $p < 0.05$ en GCM respecto del control (GCN) y GCN y P5000 respecto del grupo GCM.

Tabla N° 24. Estadística descriptiva de los marcadores de daño hepático en ratones.

	Índice de hígado (%)			Actividad ALT (U/L)		Actividad AST (U/L)	
	n	\bar{X}	D.S.	\bar{X}	D.S.	\bar{X}	D.S.
GCN	7	3,6	0,25	57,6 ^b	1,01	70,0 ^d	2,17
GCM	7	5,2	1,65	85,5 ^a	8,77	77,6 ^c	4,48
GVC	7	3,2	0,22	75,6	1,97	71,7	7,72
P650	7	5,1	2,48	75,6	4,20	67,6	2,69
P2500	7	4,8	1,48	69,8	1,26	67,0	2,20
P5000	6	4,3	1,02	63,6 ^b	2,36	63,6 ^d	2,77

^{a, b} significativo para $p < 0.05$ comparado con el GCN y comparado con el GCM, respectivamente.

^{c, d} significativo para $p < 0.01$ comparado con el GCN y comparado con el GCM, respectivamente.

4.2.2.3 Medición de los productos de la peroxidación lipídica

4.2.2.3.1 Medición de la actividad de superóxido dismutasa (SOD)

Curva de calibración

Se registraron las absorbancias, se restó el blanco de las muestras y se determinó la actividad de cada muestra y porcentaje de inhibición según indica el kit. Se graficó la curva de calibración para determinar la ecuación de la recta.

Tabla N° 25. Curva de calibración de SOD.

Concentración Estándar	LOG	%Inhibición
0.0072	-2.1415	5.178
0.0144	-1.8405	25.9223
0.0289	-1.5395	41.424
0.0578	-1.2384	65.3722
0.1155	-0.9374	93.2039

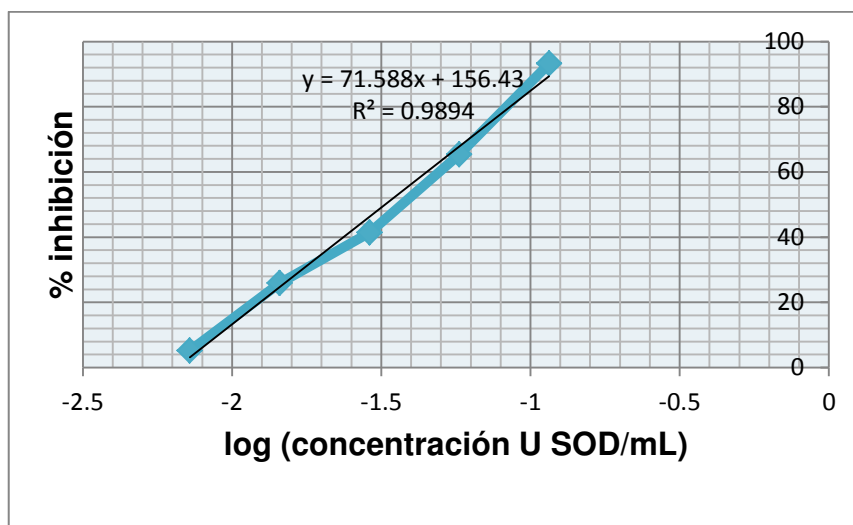


Figura N° 28. Curva de calibración de SOD.

Medición de SOD

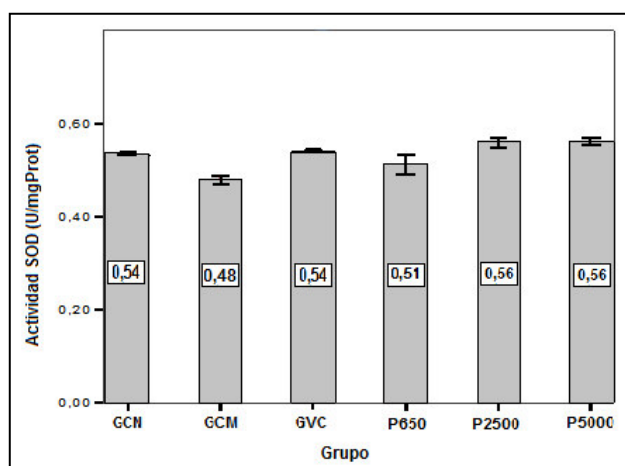


Figura N° 29. Medias estimadas de SOD. Existen diferencias significativas para $p < 0.05$ entre los diferentes grupos.

4.2.2.3.2 Medición de la actividad de catalasa (CAT)

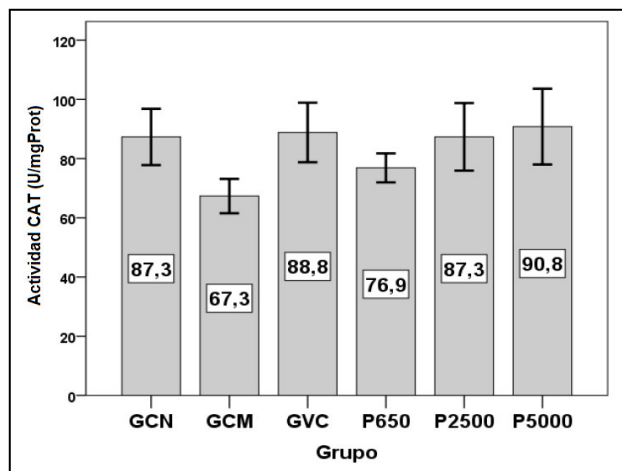


Figura N° 30. Medias estimadas de CAT. Existen diferencias significativas para $p < 0.05$ entre los diferentes grupos.

4.2.2.3.3 Medición de la actividad de glutatión peroxidasa (GPx)

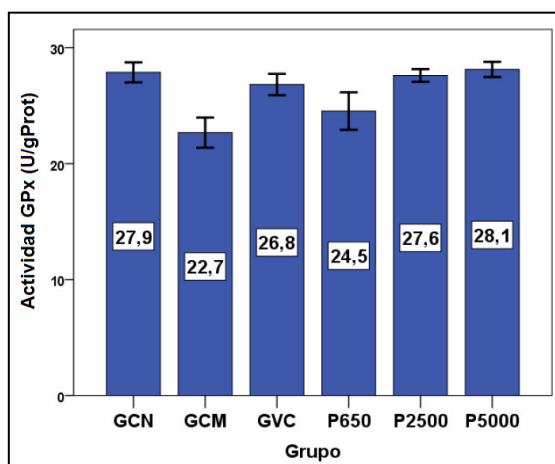


Figura N° 31. Medias estimadas de GPx. Existen diferencias significativas para $p < 0.05$ entre los diferentes grupos.

4.2.2.3.4 Medición de malondialdehído (MDA)

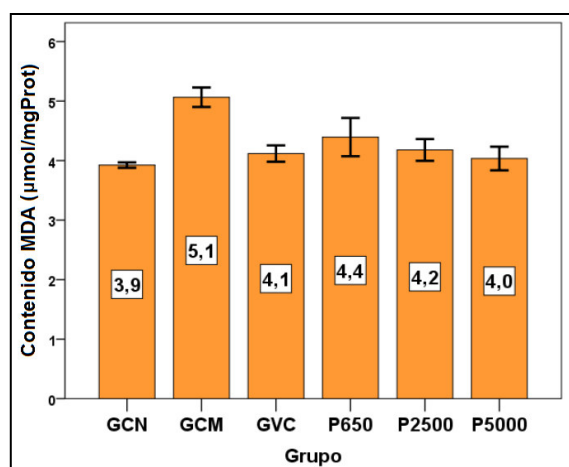


Figura N° 32. Medias estimadas de MDA. Existen diferencias significativas para $p < 0.05$ entre los diferentes grupos.

Tabla N° 26. Valores medios de las enzimas antioxidantes y MDA.

	n	Actividad SOD (U/mgProt)		Actividad GPx (U/mgProt)		Actividad CAT (U/mgProt)		Contenido MDA (umol/mgProt)	
		\bar{X}	D.S.	\bar{X}	D.S.	\bar{X}	D.S.	\bar{X}	D.S.
GCN	7	0,54 ^b	0,00	27,9 ^b	0,35	87,3 ^b	3,88	3,9 ^b	0,02
GCM	7	0,48 ^a	0,00	22,7 ^a	0,53	67,3 ^a	2,37	5,1 ^a	0,07
GVC	7	0,54 ^b	0,00	26,8 ^b	0,38	88,8 ^b	4,11	4,1 ^b	0,06
P650	7	0,51 ^{a,b}	0,20	24,5 ^{a,b}	0,66	76,9 ^b	2,00	4,4 ^{a,b}	0,13
P2500	7	0,56 ^{a,b}	0,00	27,6 ^b	0,22	87,3 ^b	4,66	4,2 ^b	0,07
P5000	6	0,56 ^{a,b}	0,03	28,1 ^b	0,25	90,8 ^b	4,98	4,0 ^b	0,08

^a significativo para $p < 0.05$ comparado con el GCN

^b significativo para $p < 0.05$ comparado con el GCM

4.2.2.3.5 Determinación de proteínas

Se leyó en el espectrofotómetro las absorbancias y se graficó la curva de calibración correspondiente. La ecuación de la recta obtenida se aplicó para expresar los resultados de los ensayos enzimáticos y MDA en miligramos de proteína.

Tabla N° 27. Curva de calibración de proteínas.

Concentración	Abs
0.5	0.011
1	0.042
2.5	0.067
5	0.098
10	0.16
20	0.221

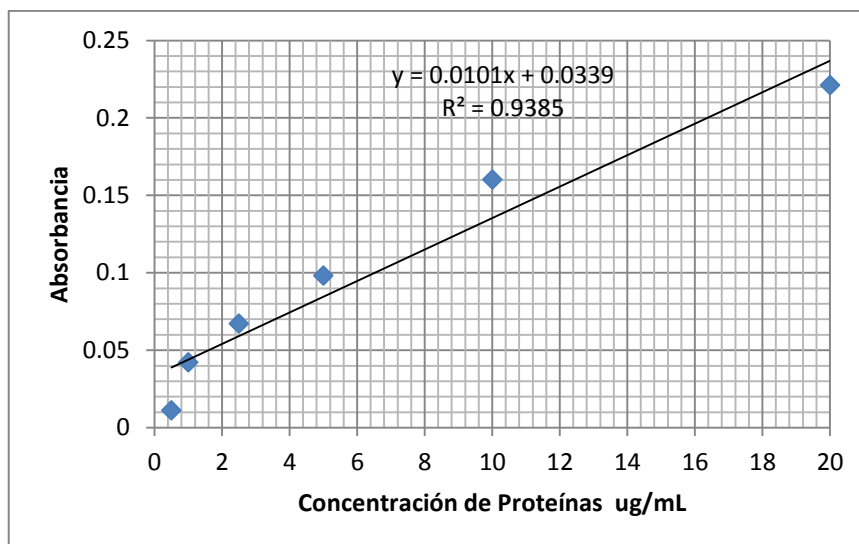


Figura N° 33. Curva de calibración de proteínas.

4.2.2.3.6 Observaciones microscópicas de tejido hepático

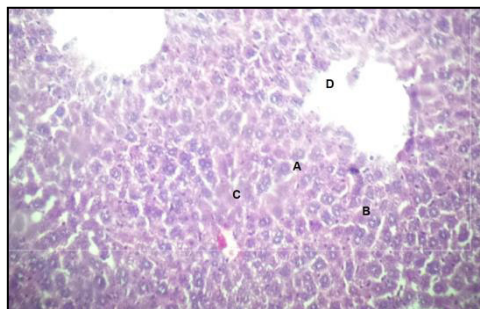


Figura N° 34. Observación microscópica de GCN (Grupo control normal). A = canales normales. B = núcleos normales. C = citoplasma normal. D = espacio porta normal.

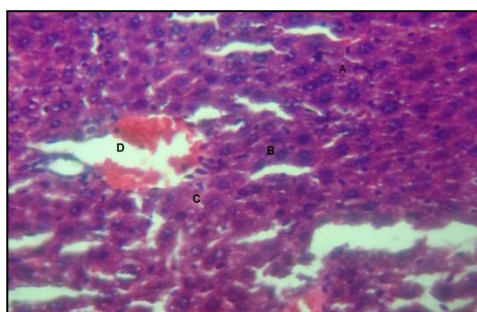


Figura N° 35. Observación microscópica de GCM (Grupo control modelo de CCl_4). A = canales edematosos. B = núcleos pulverulentos. C = citoplasma con microvesícula. D = vesículas congestivas. La estructura está moderadamente alterada.

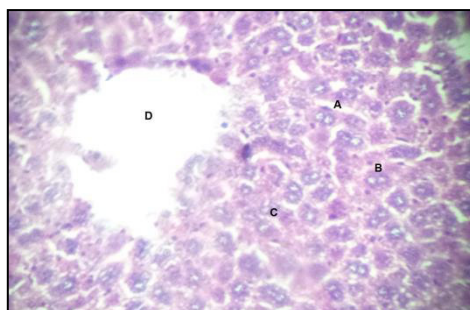


Figura N° 36. Observación microscópica de GCV (Grupo control de vitamina C). A = canales normales. B = núcleos normales. C = citoplasma con microvesícula. D = espacio porta normal. Estructura conservada.

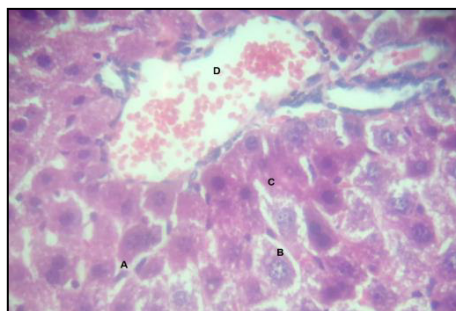


Figura N° 37. Observación microscópica de P6250 (Grupo CCl_4 + 6.25 mg/kg). A = canales edematosos, congestivos. B = núcleos pulverulentos. C = citoplasma laxo con microvacuola. D = espacio porta con infiltración de glóbulos rojos. Discreta alteración de la estructura.



Figura N° 38. Observación microscópica de P2500 (Grupo CCl_4 + 25 mg/kg). A = canales congestivos. B = núcleos pulverulentos. C = citoplasma con microvacuola. D = espacio porta con infiltración de glóbulos rojos. Estructura conservada.

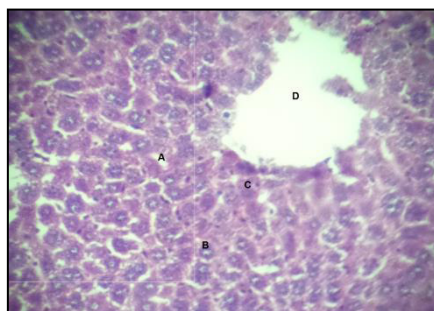


Figura N° 39. Observación microscópica de P5000 (Grupo CCl_4 + 50 mg/kg). A = canales normales. B = núcleos normales. C = citoplasma con microvesícula. D = espacio porta normal. Estructura conservada.

4.2.3 Capacidad hipolipemiante

4.2.3.1 Pesos de los conejos

Los pesos corporales de los conejos registrados diariamente desde el primer día de administración, semana 0, y el día 21, último día de tratamiento, mostraron variación significativa por grupo y semana.

Tabla N° 28. Medias de peso de conejos.

	Peso (gramos)						
	n	Semana 0		Semana 1		Semana 3	
		\bar{X}	D.S.	\bar{X}	D.S.	\bar{X}	D.S.
GC	5	2178,8	44,5	2246,5 ^b	2,4	2373,1 ^b	2,2
GH	5	2276,8	40,5	2282,0 ^a	44,2	2481,9 ^a	12,7
GG	5	2186,7	29,6	2326,5 ^{a,b}	67,5	2278,2 ^{a,b}	4,1
GP	5	2206,5	13,1	2380,8 ^{a,b}	87,9	2366,1 ^{a,b}	29,9

^a significativo comparado con el GC para $p < 0.05$. ^b significativo comparado con el GH para $p < 0.05$.

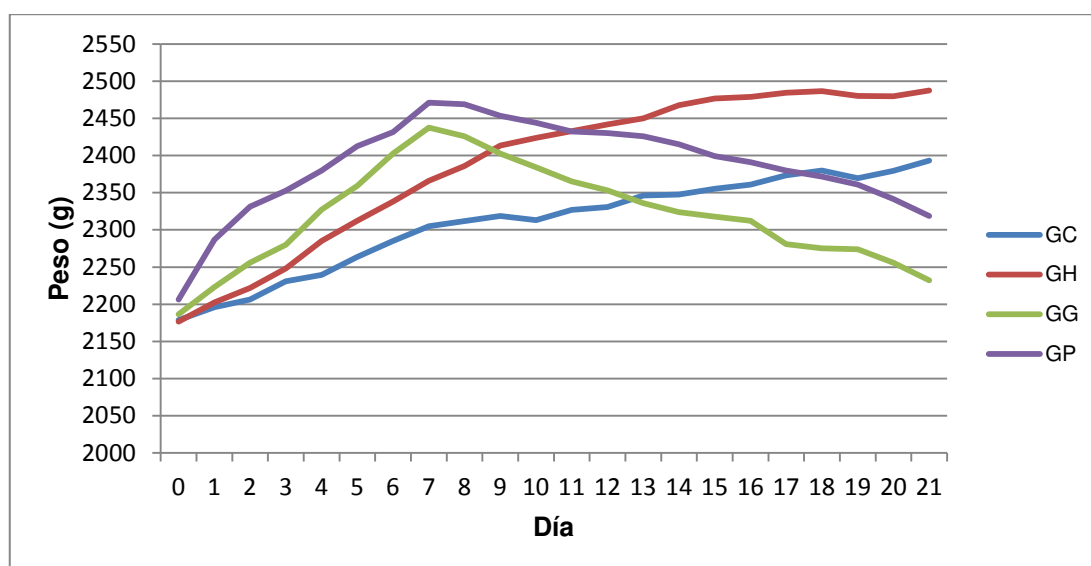


Figura N° 40. Medias de peso por día de tratamiento según grupo (conejo).
Existen diferencias significativas para $p < 0.05$ entre los diferentes grupos.

4.2.3.2 Determinación de colesterol (C)

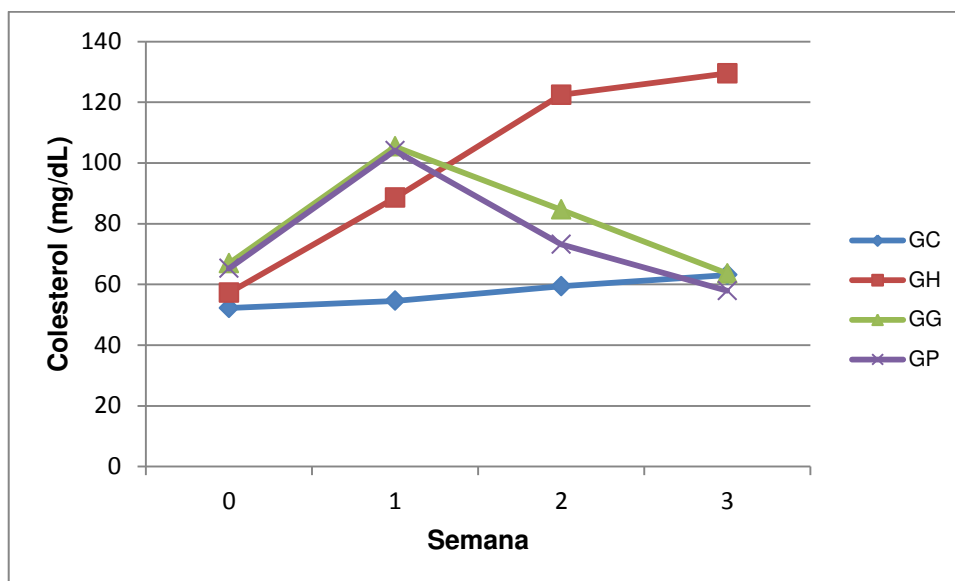


Figura N° 41. Medias por semana y grupo de tratamiento de C. Existen diferencias significativas para $p < 0.05$ entre los diferentes grupos.

4.2.3.3 Determinación de triacilgliceroles (TG)

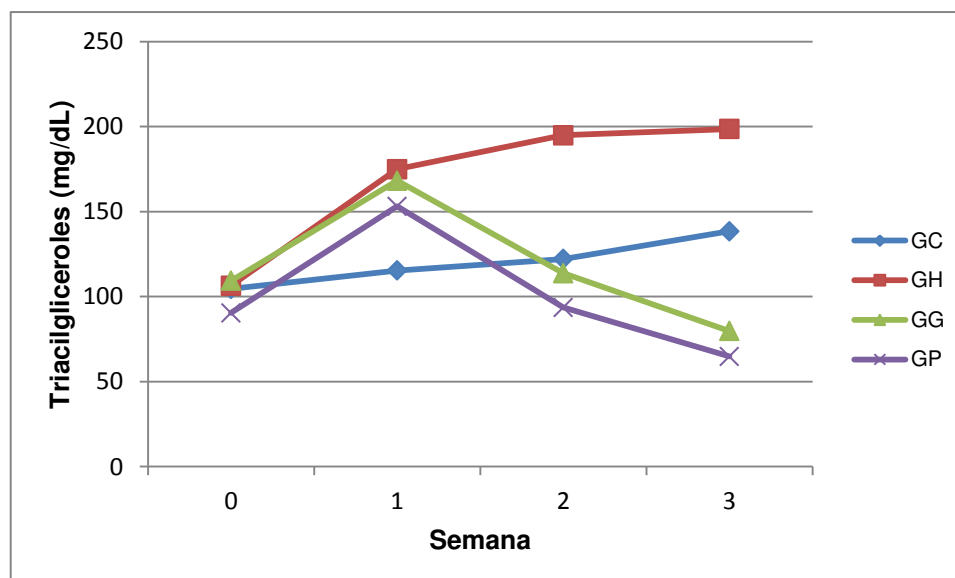


Figura N° 42. Medias por semana y grupo de tratamiento de TG. Existen diferencias significativas para $p < 0.05$ entre los diferentes grupos.

4.2.3.4 Determinación de HDL

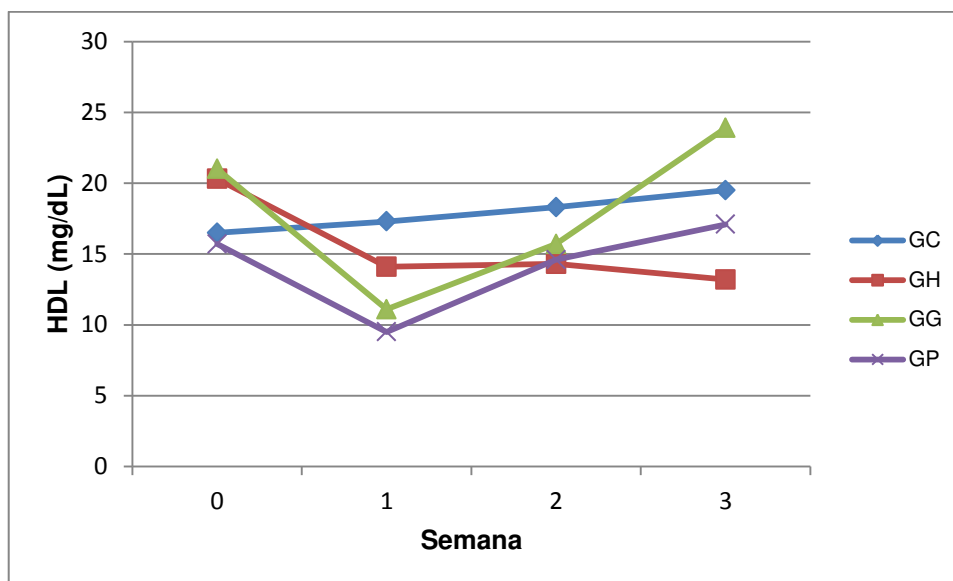


Figura Nº 43. Medias por semana y grupo de tratamiento de HDL. Existen diferencias significativas para $p < 0.05$ entre los diferentes grupos.

4.2.3.5 Determinación de LDL

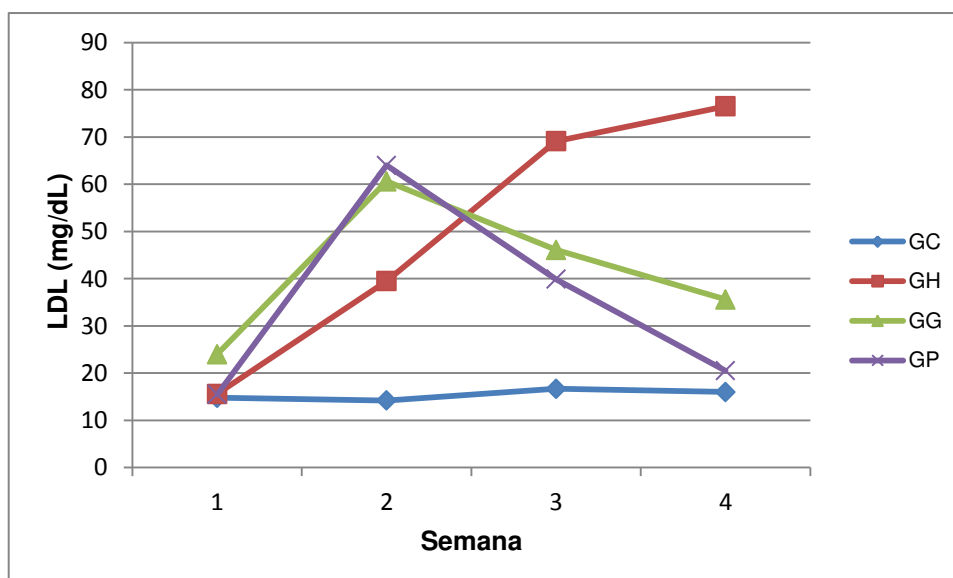


Figura Nº 44. Medias por semana y grupo de tratamiento de LDL. Existen diferencias significativas para $p < 0.05$ entre los diferentes grupos.

4.2.3.6 Determinación de VLDL

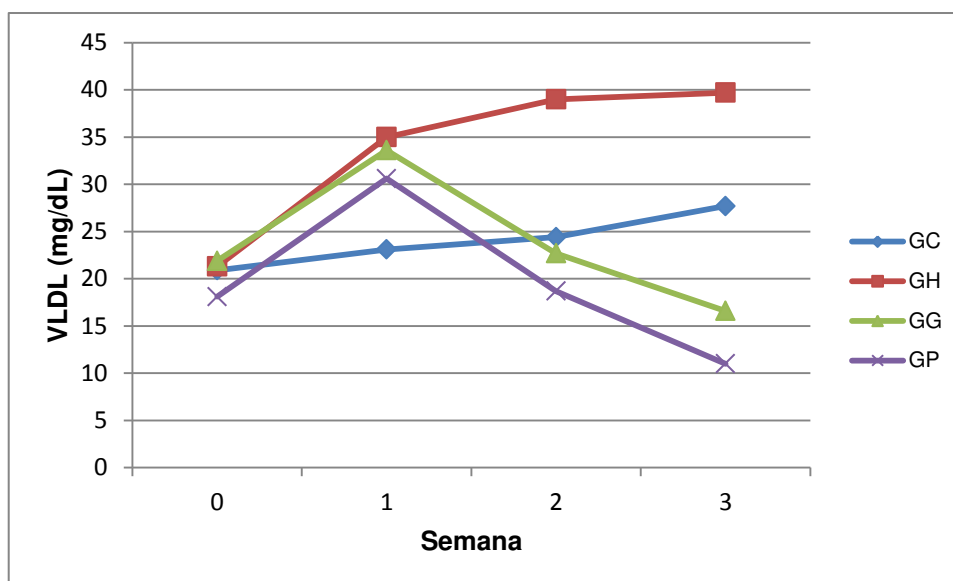


Figura N° 45. Medias por semana y grupo de tratamiento de VLDL. Existen diferencias significativas para $p < 0.05$ entre los diferentes grupos.

Tabla N° 29. Estadística descriptiva de la evolución de los marcadores lipídicos en conejos.

	n	Colesterol (mg/dL)		Triacilglicerolos (mg/dL)		HDL (mg/dL)		LDL (mg/dL)		VLDL (mg/dL)	
		\bar{X}	D.S.	\bar{X}	D.S.	\bar{X}	D.S.	\bar{X}	D.S.	\bar{X}	D.S.
GC	5	63,1 ^b	4,9	138,4 ^b	23,2	19,5 ^b	0,3	16,0 ^b	1,1	27,7 ^b	4,6
GH	5	129,5 ^a	23,1	198,6 ^a	26,4	13,2 ^a	3,7	76,5 ^a	19,9	39,7 ^a	5,3
GG	5	63,6 ^b	4,8	79,8 ^{a,b}	14,0	23,9 ^b	4,3	35,6 ^{a,b}	4,5	16,6 ^{a,b}	2,8
GP	5	57,9 ^b	15,9	54,8 ^{a,b}	13,9	17,1	2,8	20,5 ^b	11,6	11,0 ^{a,b}	2,8

^a, comparado con el GC para $p < 0.05$

^b, comparado con el GH para $p < 0.05$

V. Discusión

La importancia de las algas marinas rojas como parte de la dieta desde la antigüedad³⁵, no se ve disminuida sino por el contrario, se van sumando más investigaciones de sus diversos componentes y propiedades relacionadas a estos^{1,32,34}. Siendo los polisacáridos, los componentes mayoritarios en estas algas han sido objeto de diversidad de pruebas para establecer actividades biológicas, como lo es la actividad antioxidante, y el mecanismo por el cual se producen estas actividades para lo cual se requiere información de sus características estructurales que permitan entender mejor su comportamiento³².

Para poder estudiar el polisacárido del alga es preciso extraerlo de su fuente natural y purificarlo de forma tal que los hallazgos puedan ser conferidos, sólo, a esta molécula. En este estudio el método de extracciones acuosas en caliente y purificación con etanol al 96% rindió 14.9% de polisacárido, respecto del alga en polvo. Éste valor se obtuvo después de la liofilización y está acorde a los obtenidos para especies de *Porphyra* con el método empleado que permite obtener el polisacárido nativo, sin alteración^{30,173}. Entre tanto el contenido de 3,6-AG fue de 11.28% y el de sulfato de 15.56% los cuales aunque están dentro de los rangos reportados para otras especies como *Porphyra capensis* que varía en su contenido de 3,6-AG de 11.0 % a 12.9 % y 9.6 % a 11.7 % para sulfato según mes de recolección en el sur de África³⁰ o lucbe (*Porphyra columbina*) investigada en Chile en 1981 la cual reportó 11.6% de 3,6-AG y 15.5% de sulfato¹⁷³, no permite establecer qué valores considerar como altos o bajos para *Porphyra columbina* recolectada en Perú puesto que se requieren mayores estudios para determinar la variabilidad espacio-temporal de la especie^{174,175} los cuales aportarían además a establecer los cuidados necesarios para brindar productos de fuente algal de buena calidad a la vez que la investigación da la oportunidad de descubrir nuevos componentes o ver la posibilidad de los mismos como productos comercializables, también se podría plantear las condiciones óptimas necesarias para producción de esta alga con el fin de obtener mejores rendimientos de determinados componentes, lo cual en definitiva da paso a la industrialización^{175,176}.

Con el fin de elucidar la molécula, se empleó el análisis por espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR) en la zona del IR medio, 4000 cm^{-1} a 650 cm^{-1} , que presenta la región de la “huella dactilar”. Este análisis ha llevado a grandes avances en la aplicación del método del análisis estructural de polisacáridos, ya que incrementa la resolución de las bandas comparado al infrarrojo normal así como la sensibilidad, de ahí que actualmente es de uso en casi todos los laboratorios¹⁷⁷. A esto se suma que en el análisis se emplea la técnica de ATR (reflectancia total atenuada) de punta de diamante que permite el análisis de la muestra sin tratamiento previo, es una técnica no destructiva, y se basa en el comportamiento del haz de luz IR en un prisma con índice de refracción alto, cristal de diamante tipo IIA. El haz de luz reflejado se comporta como si penetrara de un medio más denso a uno menos denso antes de reflejarse, y si se absorbe esta radiación se produce una atenuación del haz, independiente del grosor de la muestra.

El hecho de que un espectro infrarrojo sea único para determinada molécula, más aun las moléculas complejas, pues dependerá de los enlaces presentes en los grupos funcionales y el ambiente, interacción o no con otras moléculas o átomos de la misma en que están presentes, lo hace un método idóneo de elección en elucidación estructural¹⁷⁸. El espectro muestra dentro de sus 15 picos las señales típicas para porfiranos^{30,51,178,179,180}: una señal a 3319.49 cm^{-1} , muestra grupo hidroxilo con su característica banda ancha, redondeada y simétrica; a 1215.15 cm^{-1} , se evidencia S=O grupo sulfato y es este grupo el que principalmente se quiere evidenciar en el IR; a 931.62 cm^{-1} , presencia de 3,6-anhidrogalactosa; a 889.18 cm^{-1} , β -D-galactosa no sulfatada; a 815.89 cm^{-1} , el éster sulfato se presenta unido a grupo hidroxilo primario en residuos galactosa-6-sulfato que para el caso del porfirano se sabe que son de tipo L. Cuando la posición carbono 6 de la galactosa está sulfatada se esperan bandas características a 820 y/o 867 cm^{-1} , para el caso del porfirano se presenta alrededor de 820 cm^{-1} , para todos los casos revisados. El espectro de 1200 cm^{-1} a 800 cm^{-1} , muestra las mismas señales dentro del rango leído. Los análisis de los espectros IR de *Porphyra* realizados en investigaciones anteriores por ATR, la muestra se lee sin alteración, o KBr, la muestra se

coloca entre pastillas de bromuro de potasio para su posterior lectura, tomados en consideración para la asignación de las bandas a los grupos anteriormente indicados, no se diferencian numéricamente pero si en la intensidad de las bandas por lo que no reporta mayor problema para su estudio.

La región seleccionada para el análisis por RMN- ^1H del polisacárido nativo es la que corresponde al hidrógeno del carbono anomérico en polisacáridos sulfatados. Los protones anoméricos de las hexosas tienen su zona de resonancia muy diferenciada de otras fracciones moleculares, lo que permite determinar el número de monosacáridos diferentes que tiene el polisacárido y la estereoquímica de los enlaces glicosídicos en el carbono anomérico, α o β ¹⁸¹. Son típicas las señales cercanas al rango de 5.28 a 5.15 ppm para enlaces (1 \rightarrow 4) de L-galactosas^{182,183}, que son las que se han registrado para porfiranos.

En las estructuras de los dímeros del porfirano (Figura N° 4), los carbonos anoméricos tienen un átomo de hidrógeno α para la unidad D-galactopiranososa, y un hidrógeno β para la unidad L-galactopiranososa-6-sulfato. El hidrógeno α interacciona con el hidroxilo del C-2, mientras que el hidrógeno β no interacciona^{182,184}, de allí su valor más alto de éste último, L-galactopiranososa-6-sulfato, en el espectro RMN- ^1H dando una señal a 5.161 ppm y es precursor de las unidades 3,6-anhidro- α -L-galactosa formadas por la pérdida del grupo sulfato la cual reportó una señal a 5.035 ppm. Estas dos señales son características en los espectros RMN- ^1H para los hidrógenos anoméricos. Las señales por debajo de 4 ppm corresponden a resonancias de los H-1 identificados por siempre aparecer como dobletes. Las O-metil resonancias aparecen entre 3.65 ppm y 3.40 ppm como singletes agudos superpuestos en la señal H¹ no anomérica de D-galactosa¹⁸⁵, en el espectro se identifica la señal a 3.646 de 2-O-metil- β -D-galactosa.

El alga como un todo está en equilibrio sin embargo al aislar un componente y someterlo a estudio *in vivo* es preciso tener referencias de toxicidad. Son pocos los estudios de toxicidad en algas, y de cada uno de sus componentes, ya que su uso como alimento es probablemente el mayor estudio clínico de soporte que tienen. Dentro de los que se puede mencionar está un ensayo de toxicidad

de 24 algas rojas y 9 verdes de Brasil en el cual al probar un extracto acuoso de cada alga con y sin tratamiento térmico y aplicarlo intraperitonealmente se determinó un DL50 de 63.8 mg para las algas sin tratamiento térmico 24 horas después de su administración, mientras que no se registró ninguna muerte para algas administradas con tratamiento térmico a 200°C por 10 y 20 minutos, se concluyó como moderadamente tóxico y la toxicidad se confirió a la contaminación con minerales como el arsénico al que están expuestas en el hábitat natural¹⁸⁶. Una prueba de toxicidad acumulativa realizada con carragenana de *Chondracanthus chamisso* de Perú, yuyo, mostró daño de tejido renal y hepático a dosis de 50 mg/kg y 500 mg/kg administrados por vía oral durante 7 días, entre tanto en el ensayo de toxicidad aguda de 14 días con dosis de hasta 2000 mg/kg no murió ningún animal¹⁰.

Estos hallazgos motivaron a tener un perfil de seguridad para el polisacárido en las dosis que serían probadas en el presente estudio. Para el caso de toxicidad aguda aun en dosis de 2000 mg/kg no se presentó ninguna muerte y tampoco se registraron signos de toxicidad en base a los criterios de observación establecidos por lo cual su DL50 no se encuentra en este rango. En el estudio de toxicidad oral dosis repetida de 28 días, los pesos por grupo variaron de forma significativa sólo para el grupo de dosis 50 mg/kg, el mismo que reportó daño de tejido hepático moderado; estos resultados sugieren la realización de estudios más prolongados como son los de toxicidad crónica que permitirían obtener mayor información de seguridad para el porfirano. Para la dosis repetida de 18 mg/kg no reportó ni signos de toxicidad ni daño hepático. Los conejos debían ser dosificados durante 14 días con 17.14 mg/kg de polisacárido, calculados con anterioridad, de forma que un estudio de toxicidad del doble de tiempo da soporte a la prueba hipolipemiante. No se realizaron estudios de toxicidad por vía intraperitoneal puesto que se encontraron estudios donde se empleó la misma vía y no se reportaron ni muertes ni signos de toxicidad dentro del tiempo de interés para el estudio realizado en el presente trabajo^{42,43}.

Las algas viven en diversidad de medios con condiciones muchas veces extremas de luz, salinidad o temperatura, observándose por ejemplo que son

resistentes al estrés oxidativo producido por desecación, este es el caso de *Porphyra columbina* que en un estado de sobreproducción de ROSs, hay bajos niveles de oxidación de proteínas e incremento de actividad de sus enzimas hasta que se nivelan en la rehidratación¹⁸⁷. Las algas muestran actividad no solo como entidad total o en uno de sus componentes, sino que muchas de ellas presentan la misma actividad en varios de sus componentes. La proteína, el lípido, el polisacárido o el pigmento fotosintético pueden tener todos y cada uno por separado capacidad antioxidante, por ejemplo^{95,188,189}.

Para poder estudiar la actividad antioxidante *in vivo* se indujo estrés oxidativo en los ratones. Esto se consiguió con la aplicación intraperitoneal de un hepatotóxico muy conocido como lo es el tetracloruro de carbono (CCl_4)¹⁹⁰. La metabolización del CCl_4 se da en el retículo endoplasmático hepático, implica la ruptura homolítica del enlace C-Cl, por oxidasas ligadas al sistema P-450 con formación de radicales libres por un sistema enzimático de transporte electrónico desde el NADPH al oxígeno. El radical libre CCl_3 , altamente tóxico, se puede unir a una serie de estructuras moleculares, especialmente los lípidos de membranas; al mismo tiempo los radicales libres generados oxidan lípidos, peroxidación lipídica. Se cree que el daño que produce al hígado viene mediado por alguno de estos dos procesos y no directamente por el CCl_4 ¹⁹¹. Varios estudios muestran que el CCl_4 causa un marcado aumento en los niveles de transaminasas y CAT, a la vez que los niveles de SOD y GPx se ven disminuidos pudiendo los extractos crudos de algas contrarrestar dichos desniveles, así mismo hay una mejoría del tejido hepático, sin embargo en el caso de extractos por sus variados componentes no se le puede conferir esta propiedad a algún componente del alga en particular¹⁹² y toma aún más importancia el estudio de sus componentes. Estudios en ratones empleando polisacáridos nativos muestran reducción de MDA, transaminasas, SOD y mejora del tejido hepático en proporción a dosis administrada por vía intraperitoneal⁴².

Los resultados obtenidos del estudio del índice de hígado no mostraron significancia estadística a $p < 0.05$ ni $p < 0.01$, sin embargo en la visualización histológica hubo protección del tejido hepático dosis-dependiente, por lo cual se

puede estimar un efecto hepatoprotector que no se corroboraría con el índice de hígado posiblemente por las pequeñas diferencias de peso del hígado de los animales de estudio. Para transaminasas, en el caso de AST no se encontraron diferencias significativas entre grupos salvo entre el grupo GCN y GCM, aunque cabe destacar que las medias del polisacárido fueron dosis-dependiente, variaciones más grandes de las medias y un número de animales mayor por grupo pudieron haber dado una significancia estadística para los grupos polisacárido¹⁹³; entre tanto las medias de ALT, con significancia para $p < 0.05$, muestran incremento de ésta para el grupo modelo de tetracloruro de carbono (GCM), mientras que los grupos tratados con polisacárido muestran reducciones dosis-dependiente. En la medición de ambas transaminasas los valores de grupo vitamina C muestran medias mayores o iguales a cualquier grupo tratado con polisacárido y menores al grupo GCM. Cuando hay daño hepático, sin necrosis, la transaminasa ALT es la que presenta mayor elevación como se pudo evidenciar en las medias respecto de AST¹⁹⁴. En base a la evaluación histológica y reducción de ALT se puede establecer que si hay protección del daño hepático por el polisacárido a dosis de 50 mg/kg.

La enzima SOD se ve aumentada significativamente, $p < 0.05$, para los grupos tratados con polisacárido, con valores por encima de lo normal para las dosis de 25 mg/kg y 50 mg/kg difiriendo de la vitamina C que llegó hasta valores normales, considerando que es la primera barrera de protección enzimática y la más importante, del organismo⁷⁵, los resultados son muy favorables aunque no se aprecia una variabilidad numérica grande entre grupos que tienen aumentadas o disminuidas los valores de esta enzima. En varios estudios de actividad antioxidante en ratones tratados con polisacáridos de *Porphyra* o derivados, tanto por daño hepático o envejecimiento los niveles de SOD y GPx se ven incrementados por encima de lo normal, en tanto su hepatoprotección es corroborada por visualización de tejido hepático y valores de índice de hígado u otros órganos de interés^{42,161}. Pruebas *in vitro* de diferentes algas rojas, muestran sus capacidades de barrido de radicales hidroxilo, superóxido y la capacidad de evitar la hemólisis de eritrocitos contra peróxido de hidrógeno, por lo general^{195,196,197}. Aunque los resultados sólo son indicativos de

capacidad antioxidante y no implican el mismo comportamiento *in vivo*, nos dan una idea de los posibles mecanismos de acción en el organismo, que por lo menos para el caso de *Porphyra* aún no ha sido reportado.

La prueba de CAT reporta la mayor variabilidad numérica significativa, $p < 0.05$, entre grupos dentro de las pruebas enzimáticas realizadas, viéndose que la dosis 50 mg/kg de polisacárido obtuvo los valores más altos. Todos los grupos de polisacárido y vitamina C tuvieron diferencias significativas a $p < 0.05$ con respecto del grupo modelo de tetracloruro de carbono y no se encontró diferencia entre el GCN y el resto de grupos salvo por el GCM. El comportamiento del polisacárido fue dosis-dependiente a favor del incremento de CAT, igual comportamiento se reportan en otros estudios de *Porphyras*¹⁶¹. La prueba de GPx mostró diferencia significativa a $p < 0.05$ del grupo GCN, 27.9 U/mgProt, versus el grupo GCM, 22.7 U/mgProt, al igual que de GCM con todos los grupos pero sólo la concentración de polisacárido a 50 mg/kg, 28.1 U/mgProt, reporta valores por encima de lo normal para la enzima, sin embargo no fue significativo.

Para las pruebas con enzimas en todos los casos hubo comportamiento dosis – dependiente para el polisacárido, sólo la dosis de 50 mg/kg en todos los casos dio una respuesta favorable llegando a valores normales o por encima de estos, aunque solamente en el caso de SOD fue significativo. Para los grupos P2500 y P5000 el valor medio de SOD fue en ambos casos de 0.56 U/mgProt evidenciándose significativo frente al grupo GCN cuyo valor medio fue de 0.54 U/mgProt, en otro estudio de actividad antioxidante *in vivo* en ratones a condiciones similares al del estudio también presentan valores por encima de lo normal para las dosis de 50mg/kg y 25 mg/kg siendo estos de 52.11 U/mgProt y 51.74 U/mgProt respectivamente los cuales son significativos comparado con con grupo control de CCl₄ a $p < 0.01$ pero no se diferencian del grupo control normal para ambos casos a $p < 0.01$ ⁴². En la prueba de MDA, se reportó un valor del grupo de vitamina C intermedio entre las dosis de 25 y 50 mg/kg, por lo cual podría decirse que la vitamina C actúa reaccionando con los radicales libres directamente¹⁰⁵ y no promueve el incremento de enzimas en procesos de daño oxidativo y peroxidación lipídica. Varios de los estudios de actividad

antioxidante *in vivo*, revisados, sólo presentan una o dos pruebas enzimáticas en las que se ve el incremento de las enzimas evaluadas con ligeras diferencias respecto del control normal, por lo cual este estudio brinda más datos respecto del comportamiento de enzimas y productos de peroxidación lipídica. Para la evaluación de prevención del envejecimiento se puede ver estudios de las tres enzimas del sistema enzimático, de transaminasas, tejido hepático por observación microscópica y varios índices de órganos y en todos los casos el tratamiento con polisacáridos de *Porphyras* incrementa los niveles de enzimas, reduce niveles de transaminasas y se ve cierto grado de protección del hígado en relación con la dosis, además de conseguirse niveles finales por encima de un grupo control joven, dato muy interesante que daría lugar a estudios más prolongados para ver el comportamiento del incremento de enzimas en el tiempo en ratones ancianos en búsqueda de aplicación futura para humanos¹⁶¹. En cuanto al modelo animal si bien hay relación genética con el humano tanto para el ratón como la rata, el primero pudiendo ser manipulado genéticamente para ciertos fines de estudio específico, así como practicidad en el manejo y costo es el más empleado. Consideraciones apartes o limitantes podrían ser por ejemplo el estudio de antihipertensivos donde el daño a nivel de las aortas es de difícil estudio y un modelo animal más grande como la rata es el apropiado¹⁹⁸.

Un efecto hipolipemiante probablemente lleve a la conclusión rápida de que se trata de una sustancia que reduce lípidos, lo cual es correcto. Para determinar el efecto hipolipemiante de una sustancia se pueden determinar los niveles de lípidos en suero, éste es el perfil lipídico que ha sido y es un indicador de salud y enfermedad^{199,200} y aunque ahora hay evaluación de adipocitos y la participación de lecitina en la regulación de lípidos²⁰¹, son métodos específicos de alto costo que no aplicarían como un método de análisis de laboratorio rutinario, todavía. Basados en que hay dos tipos de lípidos, colesterol y triacilgliceroles^{104,106}, que determinan este perfil por ser los más abundantes y participar en el acúmulo o no de grasa con posteriores patologías, y cuatro lipoproteínas que regulan su metabolismo, HDL, LDL, TG y VLDL, no resultaría tan complicado, como puede ser, establecer un modelo que permita estudiar el

efecto hipolipemiante de una sustancia. Antes de basarse sólo en valores cuantitativos se debe tener conocimiento de los múltiples factores que influyen en los resultados para de esa forma poder establecer interpretaciones adecuadas de los valores obtenidos. En cuanto al mecanismo de acción, aunque no es objeto de estudio de este trabajo de investigación, se pueden establecer ciertas observaciones en base a consideraciones previas y análisis de resultados obtenidos.

Para poder establecer un estudio corto como lo es el empleado en este estudio de 21 días, la mayoría de estudios con lípidos son de por lo menos 4 semanas induciendo una hiperlipemia secundaria por dos a más semanas tiempo en el cual el animal engorda así como se reporta elevación de lípidos en suero, se optó por un recurso alimentario de alto contenido de colesterol y otros lípidos que se sabe producen rápida subida de estos, este alimento son los sesos de res que cocidos se establecen como uno de los alimentos más peligrosos para la salud¹⁶⁷. El resultado de una semana de tratamiento es una elevación rápida de colesterol, elevación de TG y LDL, también se reportó aumento de peso, que permitió iniciar con el tratamiento hipolipemiante a su vez que no fueron elevaciones tan dramáticas como en otros estudios donde se pone en riesgo la vida del animal²⁰² considerando que un grupo seguirá con el tratamiento hiperlipídico hasta el final del estudio.

El material biológico más idóneo fue el conejo raza Nueva Zelanda macho joven, ya que su metabolismo es sensible a los disturbios nutricionales y a los efectos de sustancias extrañas en tanto las hembras tienen mayor predisposición a formar placas ateroscleróticas por sus altos niveles de estrógenos incrementando el riesgo de muerte durante el estudio²⁰³. En comparación con la rata, el conejo proyecta 10 veces más los volúmenes en suero que ésta y por ende un resultado positivo en ratas no implica uno positivo en conejos, siendo el segundo de mayor respaldo científico²⁰⁴. El gemfibrozilo, un fibrato, a pesar de efectos adversos conocidos, nos sirve para fines de comparación ya que a diferencia de otros medicamentos, como las estatinas, se puede evidenciar su efecto en menor tiempo. El mecanismo de acción del gemfibrozilo es incrementar la lipólisis de TG de las lipoproteínas por medio de

lipoproteína lipasa y disminuir la lipólisis intracelular en tejido adiposo, lo que da lugar a reducción de VLDL en plasma²⁰⁵.

Hay variedad de estudios del efecto hipolipemiente, a su vez variedad de metodologías empleadas, algunas consideran el peso corporal como una variable, otras no, sin embargo las más recientes investigaciones lo toman en consideración, como es el caso del estudio hipolipemiente del polisacárido nativo de *Porphyra yezoensis* en ratas que mostró elevación de HDL y disminución de colesterol total, LDL y TG tanto en suero como en hígado comparado con el grupo con dieta hiperlipídica²⁰⁶, sin embargo no se comparó con algún fármaco para ver si estas disminuciones se asemejaban al comportamiento de un fibrato o estatina. Los resultados del estudio muestran que *Porphyra columbina*, reduce colesterol, TG, LDL, VLDL significativamente, $p < 0.05$, comparado con el grupo GH. Para el caso de los TG la reducción es significativo comparado con ambos GC y GH y no hay diferencia significativa, $p < 0.05$, con el GG; el mismo escenario se presenta en los valores de VLDL. Los valores medios de HDL aunque se muestran incrementados para el GG y GP, sólo el GG mostró significancia estadística a $p < 0.05$ comparado con GH. Los resultados indicarían un comportamiento para el polisacárido más parecido a los fibratos que a las estatinas. Las reducciones de peso son notorias por lo que su aplicación en la prevención y tratamiento de la obesidad resultaría factible.

Los polisacáridos son considerados fibra la cual se estima sólo una mínima cantidad se metaboliza en estómago e hígado. Las algas como tal tienen un alto contenido de fibra, y como se sabe hay fibra soluble, que tiene la propiedad de retener agua y formar gel coloidal en el intestino el cual puede disolver lípidos lumenales y colesterol en los ácidos biliares que tendería eventualmente a reducir los valores séricos de colesterol y glucosa, y cuya digestión toma lugar en el colon por la microflora colónica; e insoluble, tiene una función similar a un laxante, agente aumentador de volumen en el intestino²⁰⁷; a las que en muchos casos se les quiere conferir la capacidad hipolipemiente del polisacárido sulfatado algal, mediada solo por mecanismos físicos y que aun ahora se acepta no es bien conocido y sigue en estudio²⁰⁸. A diferencia de las

carrageninas, los del grupo agar, como *Porphyra*, presentan menor contenido de fibra insoluble respecto del total²⁰⁹.

Lo dicho anteriormente lo corrobora un estudio realizado en el 2001 en España. Tres algas pardas marinas, *Fucus vesiculosus*, *Laminaria digitata* y *Undaria pinnatifida* y dos algas rojas marinas comestibles de diferentes géneros como lo son *Chondrus crispus* y *Porphyra tenera* de alto valor económico fueron evaluadas en su contenido de fibra soluble e insoluble así como las propiedades fisicoquímicas que presentan las mismas. El método AOAC (“Association of Official Agricultural Chemists”) para análisis de fibra dietaria adaptado para el análisis de algas y expresado en % de peso seco determinó que del total de la fibra dietaria 33.78 ± 3.38 , la fibra soluble de *Porphyra tenera* 14.56 ± 1.33 está compuesta principalmente de porfirano y pequeñas cantidades de galactosa, 3,6-AG y xilosa soluble en tanto su fibra insoluble 19.22 ± 2.05 está constituida por xilano y manano insoluble. Las algas pardas registraron de 33.58 ± 1.31 a 50.05 ± 1.77 de fibra dietaria total, 17.31 ± 0.51 a 9.80 ± 0.78 de fibra soluble compuesta por fucanos o carrageninas según la especie y 16.26 ± 2.05 a 40.29 ± 0.98 de fibra insoluble compuesta de celulosa principalmente. Estableciendo que los efectos fisiológicos de la fibra dietaria están relacionadas a sus propiedades fisicoquímicas *in vitro* se realizaron pruebas de aumento de tamaño, “hinchazón”, capacidad de retención de agua, capacidad de intercambio catiónico en el que las algas pardas reportaron valores más altos que las rojas mientras que la retención de aceite reportó valores similares (de 0.9 – 1.1 g/g de polvo seco)²¹⁰.

Considerando más aún que en estudios de toxicidad se puede apreciar que administrado por vía oral hay un daño a nivel hepático y renal y que este se podría deber a que una parte del polisacárido, la fibra soluble, se puede degradar a unidades D-galactosa, 3,6-anhidrogallactosa y otros derivados que al ser metabolizados por el hígado se eliminarían por vía renal, y darían lugar al daño observado y por lo tanto cabría la pregunta de cuánto de la fibra soluble se metaboliza y si esa porción metabolizada que contiene al grupo funcional es la causante de las actividades biológicas estudiadas.

VI. Conclusiones

1. El polisacárido aislado de *Porphyra columbina* es un porfirano, que según el espectro FT-IR se caracteriza por presentar en su estructura grupos C-O de 3,6-anhidrogactosa a 931.62 cm^{-1} , S=O de éster sulfato a 1215.15 cm^{-1} , C-O-SO₃ en C6 de gactosa a 815.89 cm^{-1} y grupo hidroxilo a 3319.49 cm^{-1} ; y por RMN-¹H muestra presencia de protón anomérico a 5.161 ppm correspondiente a 4-O- α -L-gactosa-6-sulfato y protón anomérico a 5.035 ppm correspondiente a 3,6-anhidro- α -L-gactosa; evidenciando una estructura clásica de polisacárido sulfatado del tipo porfirano.
2. El polisacárido de *Porphyra columbina* presenta capacidad antioxidante dosis-dependiente en el modelo de estudio empleado, incrementando la actividad enzimática significativamente a $p < 0.05$ de la SOD por encima del GCN a dosis de 25 mg/kg y 50 mg/kg, de la CAT y GPx en las 3 dosis de polisacárido estudiado respecto del GCM y disminuyendo productos de la peroxidación lipídica, MDA, significativamente a $p < 0.05$ hasta valores normales para las dosis de 25 mg/kg y 50 mg/kg.
3. El polisacárido de *Porphyra columbina* presenta capacidad hipolipemiente determinado por los valores del perfil lipídico realizado: disminuye colesterol, triacilgliceroles, lipoproteínas de baja densidad y lipoproteínas de muy baja densidad significativamente, $p < 0.05$, comparado con el grupo control de lipemia en sangre. La disminución de colesterol es significativa respecto del GH pero no del GG y este último alcanza valores significativos por encima de GC. La reducción de TG y VLDL fue significativa comparada con ambos GC y GH, y no se diferenció significativamente, $p < 0.05$, del GG. Los valores medios de HDL no mostraron aumento significativo a $p < 0.05$ comparado con GH.

VII. Recomendaciones

1. Realizar el análisis espectrofotométrico de masas y la RMN-¹³C.
2. Cuantificar la variación del contenido de sulfato, 3,6-anhidrogalactosa y polisacárido total del alga *Porphyra columbina* según estación y lugar de recolección en todo el Perú.
3. Establecer el mecanismo de acción de la actividad hipolipemiente que presenta el alga y la relación estructura – actividad del mismo.

VIII. Referencias Bibliográficas

1. Mohamed S. Seaweeds: A sustainable functional food for complementary and alternative therapy. *Trends in Food Sci Technol.* 2012; 23: 83-96.
2. Kang, K., Park, Y., Hwang, H. J., Kim, S. H., Lee, J. G., & Shin, H. C. Antioxidative properties of brown algae polyphenolics and their perspectives as chemopreventive agents against vascular risk factors. *Arch Pharm Res.* 2003; 26: 286-293.
3. Pomillo AB. Investigación en Química de Productos Naturales en Argentina: Vinculación con la Bioquímica. *Acta bioquím. Clín. Latinoam.* 2012; 46: 73-82.
4. Usov AI. Polysaccharides of the red algae. En: Elsevier. *Advances in Carbohydrate chemistry and Biochemistry.* 2011; 65: 129-145.
5. Asakura H, Kitahora T. Antioxidants in inflammatory Bowel Disease, Ulcerative Colitis, and Crohn Disease. En: *Bioactive Food as Dietary Interventions for Liver and Gastrointestinal Disease.* 3^a ed. London: Elsevier; 2013. P. 37-53.
6. Wang Q, Song Y, He Y, Ren D, Kow F, Qiao Z. Structural characterization of algae *Costaria costata* fucoidan and its effects on CCl₄-induced liver injury *Carbohydr Polym.* 2014; 107: 247-254.
7. Organización Mundial de la Salud [sede Web]: Centro de prensa; 2012 [Acceso en 31 de marzo de 2014]. Obesidad y sobrepeso. Disponible en <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/es/>.
8. Hakimoğlu F, Kizil G, Kanay Z, Kizil M, Isi H. The effect of ethanol extract of *Hypericum lysimachioides* on lipid profile in hypercholesterolemic rabbits and its in vitro antioxidant activity. *Atherosclerosis.* 2007; 192: 113–122.
9. Hassan S, El-Twab SA, Hetta M, Mahmoud B. Improvement of lipid profile and antioxidant of hypercholesterolemic albino rats by polysaccharides extracted from the green alga *Ulva lactuca* Linnaeus. *Saudi J Biol Sci.* 2011; 18: 333-340.
10. Alama O. Estudio del efecto hipolipemiante de polisacáridos sulfatados de la fase tetraspórica del alga *Chondracanthus chamissoi* en conejos [tesis de pregrado]. Lima; 2003.
11. Guiry MD, Guiry GM. *AlgaeBase [Sede Web]*. Galway. 2012 [Acceso en 30 de Diciembre de 2013]; Disponible en <http://www.algaebase.org>.
12. Su Yoon H, Müller KM, Sheath RG, Ott FD, Bhattacharya D. Defining the major lineages of red algae (Rhodophyta) *J. Phycol.* 2006; 42: 482-492.
13. Smith DR, Hua J, Lee RL, Keeling PJ. Relative rates of evolution among the three genetic compartments of the red alga *Porphyra* differ from those of green plants and do not correlate with genome architecture *Mol. Phylogenet.* 2012; 65: 339-344.
14. Lee, RE. Evolution of the chloroplast. En: *Phycology.* 4^a ed. New York: Cambridge University Press; 2008. P. 81-132.
15. Mackie W, Preston RD. Cell Wall and Intercellular Region Polysaccharides. En: *Algal Physiology and Biochemistry.* Vol. 10. Gran Bretaña: University of California Press; 1974. P. 40-76.
16. Barsanti L, Gualtieri P. Algae Utilization. En: *Algae anatomy, biochemistry, and Biotechnology.* 2^a ed. EE.UU.: Taylor & Francis Group; 2014. P. 271-273.
17. Pereira R, Yarish C. The role of *Porphyra* in sustainable culture systems: physiology and applications. En: Israel A, Einav R, Seckbach J. *Seaweeds and*

- their Role in Globally Changing Environments, vol. 15. Países Bajos: Springer; 2010. P. 341-354.
18. Graham JE, Wilcox LW, Graham LE. Endosymbiosis and the Origin of Eukaryotic Algae. En: Algae. 2^a ed. EE.UU.: Pearson Prentice Hall; 2008. P. 640.
 19. Kong F, Sun P, Cao M, Wang L, Mao Y. Complete mitochondrial genome of *Pyropia yezoensis*: reasserting the revision of genus *Porphyra*. Healthcare. 2013; ISSN: 1940-1736.
 20. Sutherland JE. A new look at an ancient order: Generic Revision of The Bangiales (Rhodophyta). J Phycol. 2011; 47(5): 1131–1151.
 21. Acleto C. y Endo J. Las Especies peruanas de PORPHYRA (Rhodophyta, Bangiales), I. Taxonomía y distribución geográfica. Museo de Historia Natural. UNMSM. 1977; 29: 3-10.
 22. Gupta S, Abu-Ghannam N. Recent developments in the application of seaweeds or seaweed extracts as a means for enhancing the safety and quality attributes of food. Innov Food Sci Emerg Technol. 2011; 12: 600-609.
 23. Etcheverry H, Collantes G. Cultivo Artificial de Luche, *Porphyra columbina* (Montagne 1845) (Rhodophyta, Bangiaceae). Rev Biol Mar. 1997; 16(2): 195-202.
 24. Usov, A I. Polysaccharides of the red algae. En: Advances in Carbohydrate chemistry and Biochemistry. 2011; 65: 116-125.
 25. Nunn JR, von Holdt MM. Red seaweed Polysaccharide. Parte II. *Porphyra Capensis* y la separation of D- y L- galactose by Crystallitation. J Chem Soc. 1957; 215: 1094-1097.
 26. Peat S, Turvey JR, Rees DA. Carbohydrates of the Red Algae, *Porphyra umbilicalis*. J Chem Soc. 1961; 311: 1590-1595.
 27. Rees DA, Conway E. The Structure and Biosynthesis of Porphyrin: a comparison of some Samples. Biochem J. 1962; 84: 411-416.
 28. Turvey JR, Williams TP. Sugar sulphates from the mucilage of *Porphyra umbilicalis*. En: Proceeding of Fourth International Seaweed Symposium. Oxford: Pergamon Press; 1964. P. 370-373.
 29. Anderson NS, Rees DA. Porphyrin: A Polysaccharide with a Masked Repeating Structure. J Chem Soc. 1965; 1104: 5880-5887.
 30. Zhang Q, Qi H, Zhao T, Deslandes E, Ismaeli NM, Mollay F, Critchley AT. Chemical characteristics of a polysaccharide from *Porphyra capensis* (Rodophyta). Carbohydr Res. 2005; 340: 2447-2450.
 31. Calixto MR. Sistema de Galactanos Sulfatados en *Porphyra pseudolanceolata* Krish, aislamiento y elucidación estructural de porfiranos [tesis de pregrado]. Lima; 1992.
 32. Morrice LM, McLean MW, Long WF, Williamson FB. Porphyrin Primary Structure. Eur. J Biochem. 1983; 133: 673-684.
 33. Zhang Z, Zhang Q, Wang J, Song H, Zhang H, Niu X. Chemical modification and influence of function groups on the in vitro-antioxidant activities of porphyrin from *Porphyra haitanensis*. Carbohydr Polym. 2010; 79: 290-295.
 34. Jiao G, Yu G, Zhang J, Ewart HS. Chemical Structures and Bioactivities of Sulfated Polysaccharides from Marine Algae. Mar Drugs. 2011; 9: 196-223.
 35. Liu F, Liu J, Gu J, Zhang L, Shen W, Gus T, Liu C, He P. Actividad antioxidante *ex vivo* de los polisacáridos del alga roja *Porphyra yezoensis*. Cienc Mar. 2008; 34(2): 253-261.

36. Zhang LX, Xu HL, Gu JN, Guo TT, He PM. Effects polysaccharide from *Porphyra yezoensis* on the growth of four cancer lines. *Biotechnol.* 2007; 18: 608-611.
37. Yoshizawa Y, Ametami A, Tsunehiro S, Nomura K, Itoh M, Fukui F, et al. Macrophage Stimulation Activity of the Polysaccharide Fraction from a Marine Alga (*Porphyra yezoensis*): Structure-Function Relationships and Improved Solubility. *Biosci Biotech Biochem.* 1995; 59(10): 1933-1995.
38. Zhang Z, Zhang Q, Wang J, Shi X, Song H, Zhang J. *In vitro* antioxidant activities of acetylated, phosphorylated and benzoylated derivatives of porphyran extracted from *Porphyra haitanensis*. *Carbohydr Polym.* Elsevier Ltd. 2009; 78(3): 449-453.
39. Ishihara K, Oyamada S, Matsushima R, Murata M, Muraoka T. Inhibitory effect of porphyran, prepared from dried “Nori”, on contact hypersensitivity in mice. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2005; 69(10): 1824-1830.
40. Bhatia S, Rathee P, Sharma K, Chaugule BB, Kar N, Bera T. Immuno-modulation effect of sulphated polysaccharide (porphyran) from *Porphyra vietnamensis*. *Int J Biol Macromol.* Elsevier B.V. 2013; 57: 50-56.
41. Zhang Z, Zhang Q, Wang J, Song H, Zhang H, Niu X. Regioselective syntheses of sulfated porphyrans from *Porphyra haitanensis* and their antioxidant and anticoagulant activities *in vitro*. *Carbohydr Polym.* 2010; 79(4):1124-1129.
42. Guo T, Xu H, Zhang L, Zhang J, Guo Y, Gu J, et al. *In vivo* protective effect of *Porphyra yezoensis* polysaccharide against carbon tetrachloride induced hepatotoxicity in mice. *Regul Toxicol Pharmacol.* 2007; 49(2):101-106.
43. Zhang Q, Li N, Zhou G, Lu X, Xu Z, Li Z. *In vivo* antioxidant activity of polysaccharide fraction from *Porphyra haitanensis* (Rhodophyta) in aging mice. *Pharmacol Res.* 2003; 48(2): 151-155.
44. Tsuge M, Okabe T, Yoshimura T, Sumi H, Tachibana K. Dietary effects of porphyran from *Porphyra yezoensis* on growth and lipid metabolism of Sprague Dawley rats. *Food Sci Technol Res.* 2004; 10: 147-151.
45. Zhang L, Cai C, Guo T, Gu J, Xu H. Anti-cancer effects of polysaccharide and phycocyanin. *J Mar Sci Technol.* 2011; 19(4): 377-382.
46. McHugh, DJ. Perspectivas para la producción de algas marinas en los países en desarrollo. [monografías en internet]. FAO Circular de Pesca. No. 968. Roma, FAO. 2002. [acceso en 25 de diciembre de 2013]. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/004/y3550s/Y3550S00.htm>.
47. Instituto Nacional de Salud [sede Web]. Lima: Editor; 16 de julio de 2010 [Acceso en 01 de abril de 2014]. La mejor receta. Timpuscca. Disponible en: http://www.ins.gob.pe/repositorioaps/0/5/not/receta_16072010/Receta%20Timpuscca.pdf.
48. Quiral V, Morales C, Sepúlveda M, Schwartz M. Propiedades nutritivas y saludables de algas marinas y su potencialidad como ingrediente funcional. *Rev Chil Nutr.* 2012; 39(4): 196-202.
49. Rodríguez M, Tamayo B, Garateix A. Los Organismos Marinos y los Cosméticos. Revista electrónica de la Agencia de Medio Ambiente. [revista en Internet] 2010 [30 de abril de 2014]; 19. Disponible en: <http://ama.redciencia.cu/117holester/19.05.pdf>.
50. Yang Y. Chinese Herbal Medicines: Comparisons and Characteristics. Churchill-Livingstone. London. 2002.

51. Zhou C, Yu X, Zhang Y, He R, Ma H. Ultrasonic degradation, purification and analysis of structure and antioxidant activity of polysaccharide from *Porphyra yezoensis* Ueda. Carbohydr Polym. 2012; 87(3):2046-2051.
52. Sun L, Wang L, Zhou Y. Immunomodulation and antitumor activities of different-molecular-weight polysaccharides from *Porphyridium cruentum*. Carbohydr Polym. 2012; 87: 1206-1210.
53. Winyard P, Hidder R, Brailsford S, Drake A, Lunec J, Blake D. Effects of Oxidative Stress on some physicochemical properties of ceruloplasmin. J Biochem. 1989; 258: 438-445.
54. Rodriguez J, Menendez J, Trujillo Y. Radicales Libres en la Biomedicina y Estrés Oxidativo. Rev Cub Med Mil. 2001; 30: 15-20.
55. Amarowicz R, Pegg RB, Rahimi-Moghaddam P, Barl B, Weil JA. Free radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the Canadian prairies. Food Chem. 2004; 84, 551-562.
56. Roche E, Romero D. Estrés Oxidativo y Degradación de Proteínas. Med Clin. 1994; 103: 189-196.
57. Lu J, Lin PH, Yao Q, Chen C. Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: experimental approaches and model systems. J Cell Mod Med. 2010; 14: 840-860.
58. Elejalde J. Estrés Oxidativo, Enfermedades y Tratamientos Antioxidantes. Ann Med Intern. 2001; 18: 326-335.
59. Flora SJS. Structural, chemical and biological aspects of antioxidants for strategies against metal and metalloid exposure. Oxid Med Cell Longev. 2009; 2(4):191-206.
60. Carrocho M, Ferreira ICFR. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. Food Chem Toxicol. 2013; 51: 15-25.
61. Harsh Mohan, Cell Injury and cellular Adaptations. En: Textbook of Pathology. New Delhi: Jaypee Brothers medical publishers; 2010. P. 21-34.
62. Giles GI, Tasker KM, Jacob C. Hypothesis: the role of reactive sulfur species in oxidative stress. Free Radic Biol Med. 2001; 31: 1279-1283.
63. Sailaja RP, Kalva S, Yerramilli A, Mamidi S. Free Radicals and Tissue Damage : Role of Antioxidants. Free Radic Antioxid. 2011; 1(4): 2-7.
64. Cardoso S, Santos RX, Carvalho C, Correia S, Santos SN, Moreira PI. Mitochondrial uncoupling proteins and oxidative stress: Implications for Diabetes and Neurodegeneration. Free Radic Antioxid. 2011; 1(2): 4-14.
65. Gutteridge MC. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. Clin Chem. 1995; 41(12): 1819-1828.
66. Boveris A. La evolución del concepto de radicales libres en biología y medicina. Ars Pharm. 2005; 46(1): 85-91.
67. Tank L, Zhang Y, Qian Z, Shen X. The Mechanism of Fe+2 initiated Lipid Peroxidation in Liposomes: The dual function of ferrous ions, the roles of the pre-existing lipid peroxides and the lipid peroxy radical. J Biochem. 2000; 352: 27-36.
68. Södergren E. Lipid Peroxidation *in vivo*: Evaluation and application of methods for measurement [tesis doctoral]. Uppsala: Acta Universitatis Upsaliensis, Uppsala Universitet; 2000.
69. Halliwell B, Gutteridge JM. The definition and measurement of antioxidants in biological systems. Free Radic Biol Med. 1995; 18: 125-126.

70. Halliwell B. Biochemistry of oxidative stress. *Biochem Soc Trans.* 2007; 35: 1147-1150.
71. Halliwell B. Free radicals and antioxidants – quo vadis? *Trends Pharmacol Sci.* 2010; 32: 125-130.
72. Kancheva VD. Phenolic antioxidants – radical-scavenging and chainbreaking activity: a comparative study. *Eur J Lipid Sci Technol.* 2009; 111: 1072-1089.
73. Zamora JD. Antioxidants: micronutrients fighting for health. *Rev Chil Nutr.* 2007; 34: 1-11.
74. Lademann J, Patzelt A, Schanzer S, Richter H, Meinke MC, Sterry W, et al. Uptake of antioxidants by natural nutrition and supplementation: pros and cons from the dermatological point of view. *Skin Pharmacol Physiol.* 2011; 24(5): 269-273.
75. Miao L, St Clair DK. Regulation of superoxide dismutase genes: implications in disease. *Free Radic Biol Med.* 2009; 47(4): 344-356.
76. Domínguez A. Modificaciones de la superóxido dismutasa para mejorar sus propiedades biofarmacéuticas. *Biotechnol Apl.* 2006; 23: 11-16.
77. Nicholls P. Classical catalase: Ancient and modern. *Arch Biochem Biophys.* 2012; 525: 95-101.
78. Aebi H. Catalase. En: Ulrich H. *Methods of Enzymatic Analysis.* Vol 2. 2^a ed. New York: Academic Press; 1974. P. 673-684.
79. Ratnam DV, Ankola DD, Bhardwaj V, Sahana DK, Kumar NMVR. Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: a pharmaceutical perspective. *J Control Release.* 2006; 113: 189-207.
80. Ghezzi P. Role of glutathione in immunity and inflammation in the lung. *Int J Gen Med.* 2011; 4: 105-113.
81. L AL, A CF, Lazarova Z, V RB, R SHS. Antioxidantes, un paradigma en el tratamiento de enfermedades Antioxidants, a paradigm for diseases treatment. *Rev Anacem.* 2012; 6: 48-53.
82. Montero M. Los Radicales Libres y las Defensas Antioxidantes. *Anales de la Facultad de Medicina* 1996; 57(4): 278-281.
83. Dasgupta A. *Introduction to Free Radicals and the Body's Antioxidant Defense. Antioxidant in Food, Vitamins and Supplements: Prevention and Treatment of Disease.* San Diego: Elsevier Inc.; 2014. P. 1-18.
84. Pérez P, Pérez J. Métodos para medir el daño oxidativo. *Rev Cub Med Mil.* 1999; 29(3): 192-198.
85. Traber MG, Atkinson J. Vitamina E, antioxidant and nothing more. *J Free Radic Biol Med.* 2007; 43: 4-15.
86. Burton GW, Traber MG. Vitamin E: antioxidant activity, biokinetics, and bioavailability. *Annu Rev Nutr.* 1990; 19: 357-382.
87. Li Y, Schellhorn HE. New developments and novel therapeutic perspectives for vitamin C. *J Nutr.* 2007; 137: 2171-2184.
88. Du J, Cullen JJ, Buettner GR. Ascorbic acid: chemistry, biology and the treatment of cancer. *Acta Biochim Biophys.* 2012; 1826(2):443-457.
89. Kim KN, Pie JE, Park JH, Park YH, Kim HW, Kim MK. Retinoic acid and ascorbic acid act synergistically in inhibiting human breast cancer cell proliferation. *J Nutr Biochem.* 2006; 17: 454-462.
90. Jee J, Lim S, Park J, Kim C. Stabilization of all-*trans* retinol by loading lipophilic antioxidants in solid lipid nanoparticles. *Eur J Pharm Biopharm.* 2006; 63: 134-139.

91. Turunen M, Olsson J, Dallner G. Metabolism and function of coenzyme Q. *Acta Biochem Biophys.* 2004; 1660: 171-199.
92. Sindhi V, Gupta V, Sharma K, Bhatnagar S, Kumari R, Dhaka N. Potential applications of antioxidants – A review. *J Pharm Res.* 2013; 7: 828-835.
93. Robbins D, Zhao Y. The role of manganese superoxide dismutase in skin cancer. *Enzyme Res.* 2011; 2011: 1-7.
94. Johnson F, Giulivi C. Superoxide dismutase and their impact upon human health. *Mol Aspects Med.* 2005; 26: 340-352.
95. Cian RE, Salgado PR, Drago SR, González RJ, Mauri AN. Development of naturally activated edible films with antioxidant properties prepared from red seaweed *Porphyra columbina* biopolymers. *Food Chem.* 2014; 146: 6-14.
96. Jain R, Sharma A, Gupta S, Sarethy I, Gabrani R. *Solanum nigrum*: current perspectives on therapeutic properties. *Altern Med Rev.* 2011; 16: 78-85.
97. Matés JM. Effects of antioxidants enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. *Toxicology.* 2000; 153: 83-104.
98. Suntres, ZE. Liposomal antioxidants for protection against oxidant-induced damage. *J Toxicol.* 2011; 2011: 1-16.
99. Psaty BM, Lumley T. Surrogate end points and FDA approval. A tale of 2 lipid-altering drugs. *JAMA.* 2008; 299:1474-1476.
100. Real Academia Española. Disquisición. En *Diccionario de la lengua española* 22.^a ed. 2001. [Acceso en 01 de mayo de 2014]. Disponible en <http://lema.rae.es/drae/?val=metabolismo>.
101. Matthews K, Holde K. Bioquímica. 2^a ed. Ed InteramericanaMc Graw Hill Interamericana. Barcelona. 2001.
102. Valenzuela R, Valenzuela A. Overview About Lipid Structure. En: Valenzuela R. *Lipid Metabolism*. Santiago de Chile: InTech; 2013. P. 3-20.
103. Morzycki JW. Recent advances in cholesterol chemistry. *Steroids* [Internet]. Elsevier Inc.; 2014 [Acceso en 26 abril de 2014]; 83:62-79. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24555984>.
104. Page C, Curtis M, Sutter M. *Farmacología Integrada*. Editorial Brace. Barcelona 1998. P. 267- 270.
105. Guyton A, Hall J. *Metabolismo de los lípidos*. En: *Tratado de Fisiología Médica*. 9^a ed. Madrid: Interamericana Mc Graw Hill. 2011.
106. Goodman & Gilman. *Principios Generales Hipercolesterolemia familiar*. En: *Las bases farmacológicas de la terapéutica*. Vol. I. 12^a ed. México D.F.: Mc. Graw-ill Interamericana. 2011. P. 83-110.
107. Musso G, Gambino R, Cassader M. Cholesterol metabolism and the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis. *Prog Lipid Res.* 2013; 52: 175-191.
108. van der Wulp MYM, Verkade HJ, Groen AK. Regulation of cholesterol homeostasis. *Mol Cell Endocrinol.* 2013; 368: 1-16.
109. Buhaescu I, Izzedine H. Mevalonate pathway: a review of clinical and therapeutical implications. *Clin Biochem.* 2007; 40: 575-584.
110. Mazein A, Watterson S, Hsieh W-Y, Griffiths WJ, Ghazal P. A comprehensive machine-readable view of the mammalian cholesterol biosynthesis pathway. *Biochem Pharmacol.* Elsevier Inc.; 2013; 86: 56-66.
111. Quiroga AD, Lehner R. Liver triacylglycerol lipases. *Acta Biochim Biophys.* 2012; 1821: 762-769.

112. Ballantyne CM. Clinical Lipidology: A Companion to Braunwald's Heart Disease. China: Elsevier Inc.; 2008.
113. Aguilar CA, Gómez FJ, Leman I, Vásquez C, Pérez O, Posadas C. Diagnóstico y tratamiento de las dislipidemias, posición de la SMNE. *Rev Endocrinol Nutr.* 2004; 12: 7-41.
114. Nakajima K, Nakano T, Tokita Y, Nagamine T, Inazu A, Kobayashi J, et al. Postprandial lipoprotein metabolism: VLDL vs chylomicrons. *Acta Clin Chim.* 2011; 412: 1306-1318.
115. Davis PG, Waggoner JD. Lipid and Lipoprotein Metabolism. En: Moffatt RJ, Stamford B. *Lipid Metabolism and Health.* EE.UU.: Taylor & Francis Group.; 2006. P. 47-58.
116. X Ong JM, Kern PA. Effect of feeding and obesity on lipoprotein lipase activity, immunoreactive protein, and messenger RNA levels in human adipose tissue. *J Clin Invest.* 1989; 84: 305-311.
117. Meyer BJ, Caslake MJ, McConnell MM, Packard CJ. Two subpopulations of intermediate density lipoprotein and their relationship to plasma triglyceride and cholesterol levels. *Atherosclerosis.* 2000; 153: 355-362.
118. Hodis HN, Mack WJ, Dunn M, Liu C, Selzer RH, Krauss RM. Intermediate density lipoproteins and the progression of carotid arterial wall intima-media thickness. *Circulation.* 1997; 95: 2022-2026.
119. Babin P, Gibbons G. The evolution of plasma cholesterol: direct utility or a "sprandrel" of hepatic lipid metabolism? *Prog Lipid Res.* 2009; 48: 73-91.
120. Kastelein JJ, van der Steeg WA, Holme I, Gaffney M, Cater NB, Barter P. Lipids, apolipoproteins, and their ratios in relation to cardiovascular events with statin treatment. *Circulation.* 2008; 117: 3002-3009.
121. Stein E, Raal FJ. Targeting LDL: Is lower better and is it safe? *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* [Internet]. Elsevier Ltd; 2014 [Acceso en 31 de abril de 2014]; 28: 309-324. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24840261>.
122. Bjerregaard P. The association of n-3 fatty acids with serum High Density Cholesterol (HDL) is modulated by sex but not by Inuit ancestry. *Atherosclerosis.* Elsevier Ltd. 2013; 226: 281-285.
123. Elsäe S, Ahnström J, Christoffersen C, Hoofnagle AN, Plomgaard P, Heinecke JW, et al. Apolipoprotein M binds oxidized phospholipids and increases the antioxidant effect of HDL. *Atherosclerosis.* Elsevier Ireland Ltd; 2012;221:91-97.
124. Sviridov D, Nestel P. Dynamics of reverse cholesterol transport: protection against atherosclerosis. *Atherosclerosis.* 2002; 161: 245-254.
125. Beers MH, Porter RS, Jones TV, Kaplan JL. *El Manual Merck de Diagnóstico y Tratamiento.* Madrid: Elsevier; 2007.
126. Sharma U, Kishore J, Garg A, Anand T, Chakraborty M, Lali P. Dyslipidemia and associated risk factors in a resettlement colony of Delhi. *J Clin Lipidol.* 2013; 7: 653-660.
127. Miguel PE. Dislipidemias. *ACIMED.* 2009; 20(6): 265-273.
128. Articles O. An International Atherosclerosis Society Position Paper: global recommendations for the management of dyslipidemia—full report. *J Clin Lipidol* [Internet]. 2014 [Acceso en 27 de abril de 2014]; 8: 29–60. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24528685>.

129. Sharma R. Omega-3 Fatty Acids in Prevention of Cardiovascular Disease in Humans: Chemistry, Dyslipidemia. En: *Bioactive Food as Dietary Interventions for Cardiovascular Disease*. Chicago: Elsevier Inc.; 2013. P. 465-489.
130. Qian Q, Chen H, Tian XH. Exploration for Hyperlipemia TCM Syndromes Classification Inconsistent Analysis Shenzhen. *Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi*. 2007; 17(2): 25-26.
131. Rosolova H, Dobiasova M, Soska V, Blaha V, Ceska R, Nussbaumerova B, et al. Combined therapy of mixed dyslipidemia in patients with high cardiovascular risk and changes in the lipid target values and atherogenic index of plasma. *Cor Vasa. The Czech Soc Cardiol* [Internet]. 2014 [Acceso en 27 de abril de 2014]; 56: 133-139. Disponible en: [p://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0010865014000125](http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0010865014000125).
132. Mattes RD. Fat taste and lipid metabolism in humans. *Physiol Behav*. 2005; 86(5): 691–697.
133. Organización mundial de la Salud. Centro de Prensa. Obesidad y sobrepeso. [Internet]. EE.UU: WHO; 2014 [Acceso en 20 de Setiembre de 2014]. Disponible en <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/es/>.
134. Raine KD, Plotnikoff R, Schopflocher D, Lytvyak E, Nykiforuk CIJ, Storey K, et al. Healthy Alberta Communities: impact of a three-year community-based obesity and chronic disease prevention intervention. *Prev Med (Baltim)*. 2013; 57: 955-962.
135. Steinberg D. An interpretative history of the cholesterol controversy, part V: The discovery of the statins and end of the controversy. *J Lipid Res*. 2006; 47: 1339-1381.
136. Stocks N, Allan J, Mansfield P. Management of hyperlipemia. *Aust Fam Physician*. 2005; 34(6):447-451.
137. Ravnskov U, Rosch P, Sutter M. Should we lower cholesterol as much as possible. *BMJ*. 2006; 332: 1331-1332.
138. Chen C, Chuang S, Fang C, Huang L, Hsieh I, Pan W et al. Gender Difference in Statin Intervention on Blood Lipid Control among Patients with Coronary Heart Disease. *Int J Gerontol*. 2008; 7: 116-121.
139. Bruckert E, Ferrières J. Evidence supporting primary prevention of cardiovascular diseases with statins: Gaps between updated clinical results and actual practice. *Arch Cardiovasc Dis* [Internet]. Elsevier Masson SAS; 2014 [Acceso en 29 de abril 2014]; 107: 188–200. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24613429>.
140. Fazio S. Management of mixed dyslipidemia in patients with or at risk for cardiovascular disease: a role for combination fibrate therapy. *Clin Ther*. 2008; 30: 294-306.
141. Davidson MH, Armani A, McKenney JM, Jacobson TA. Safety Considerations with Fibrate Therapy. *Am J Cardiol*. 2007; 99: 3-18.
142. Davidson MH, Armani A, McKenney JM, Jacobson TA. Safety considerations with fibrate therapy. *Am J Cardiol*. 2007; 99: 3-18.
143. Julius U, Fischer S. Nicotinic acid as a lipid-modifying drug—a review. *Atheroscler Suppl*. Elsevier Ltd. 2013; 14: 7-13.
144. Klempel MC, Kroeger CM, Varady K. Alternate day fasting (ADF) with a high-fat diet produces similar weight loss and cardio-protection as ADF with a low-fat diet. *Metabolism*. Elsevier Inc. 2013; 62: 137-143.

145. Schwingshackl L, Hoffmann G. Comparison of effects of long-term low-fat vs high-fat diets on blood lipid levels in overweight or obese patients: a systematic review and meta-analysis. *J Acad Nutr Diet*. 2013; 113: 1640-1661.
146. McEneny J, McPherson P, Spence M, Bradley U, Blair S, McKinley M, et al. Does a diet high or low in fat influence the oxidation potential of VLDL, LDL and HDL subfractions? *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. Elsevier Ltd. 2013; 23(7): 612-618.
147. Benoit B, Plaisancié P, Awada M, Géloën A, Estienne M, Capel F, et al. High-fat diet action on adiposity, inflammation, and insulin sensitivity depends on the control low-fat diet. *Nutr Res*. 2013; 33: 952-960.
148. Xu C, Lin X, Wang Y. Clinical Observation on Hyperlipemia Treated with Antihyperlipidemic Decoction. *J Tradit Chinese Med*. 2009; 29(2): 121-124.
149. Fuentes FM, Mendoza RM, Rosales AR, Cisneros RA. Guía de manejo y cuidado de animales de laboratorio: ratón. Lima: INS. 2008.
150. Fuentes FM, Mendoza RM, Rosales AR, Cisneros RA. Guía de manejo y cuidado de animales de laboratorio: conejo. Lima: INS 2010.
151. Riaño N. Gravimetría. Fundamentos de química analítica básica. Análisis cuantitativo. 2ª ed. Colombia: Universidad de Caldas. 2007. P. 133.
152. Yaphe W. Improved resorcinol reagent for the determination of fructose, and of 3,6-anhydrogalactose in polysaccharides. *Anal Biochem*. 1965; 13: 143-148.
153. Jackson SG, Mccandless EL. Simple, rapid, turbidometric determination of inorganic sulfate and/or protein. *Anal biochem*. 1978; 90(2): 802-808.
154. Rees DA. A Note on the Characterization of Carbohydrate Sulphates by Acid Hydrolysis. *Biochem J*. 1963; 88: 343-345.
155. OECD iLibrary. Test No. 420: Acute Oral Toxicity – Fixed Dose Procedure [Internet]. Paris; 2001, [Acceso en 31 de mayo de 2014]. Disponible en: http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-420-acute-oral-toxicity-fixed-dose-procedure_9789264070943-en.
156. OECD iLibrary. Test No. 423: Acute Oral Toxicity – Acute Toxic Class Method [Internet]. Paris; 2001, [Acceso en 31 de mayo de 2014]. Disponible en: http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-423-acute-oral-toxicity-acute-toxic-class-method_9789264071001-en.
157. OECD iLibrary. Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Human Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Paris; 2000. Disponible en: <http://www.oecd-ilibrary.org/docserver/download/9750191e.pdf?expires=1403558576&id=id&accname=guest&checksum=302824468^83CEA74EAA5EE849F9F134>.
158. OECD iLibrary. Test No. 407. Repeated Dose 28-Day Oral Toxicity Study in Rodents. Paris; 2008. Disponible en: <http://www.oecd-ilibrary.org/docserver/download/9740701e.pdf?expires=1403560085&id=id&accname=guest&checksum=A8B849D9886EC09FEFC42AFBA0F5686C>.
159. Greaves P. Liver and Pancreas Histopathology of Preclinical Toxicity Studies. 4ª ed. Leicester: Academic Press. 2012. P. 433-535.
160. Del Mestro RF, McDonald W. Oxidative Enzymes in Tissue Homogenates. CRC Handbook of Methods for Oxygen Radical Research. Boca Ratón, Fla.: CRC Press, 1990; 2: 291-296.
161. Zhang Q, Li N, Zhou G, Lu X, Xu Z, Li Z. In vivo antioxidant activity of polysaccharide fraction from *Porphyra haitanesis* (Rhodophyta) in aging mice. *Pharmacol Res*. 2003; 48(2):151–155.

162. Reitman S, Frankel S. A colorimetric method for the determination of serum 124holeste oxalacetic and glutamic pyruvic transaminases. *Am J Clin Pathol.* 1957; 28: 56-63.
163. Woolliams JA, Wiener G. Anderson PH, McMurray CH. Variation in the activities of glutathione-peroxidase and superoxide-dismutase and in the concentration of copper in the blood in various breed crosses of sheep. *Res Vet Sci.* 1983; 34(3):253-256.
164. Plagia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med.* 1967; 70: 158-169.
165. Buege JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 1978; 52: 302-310.
166. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976; 72: 248-254.
167. Menchú MT, Mendez H. Tabla de Composición de Alimentos de Centroamérica. 2ª ed. Guatemala: INCAP/OPS; 2007.
168. Lacy C, Armstrong LL, Goldman MP, Lance LL. Drug Information Handbook with Internacional Trade Names Index. 15ª ed. Hudson, OH: Lexi-comp Inc.; 2007-2008.
169. Abell LL, Levvy BB. A Simplified Method for the Estimation of total cholesterol in serum and demonstration of its specificity. *J boil Chem.* 1952; 195: 357-366.
170. Fossati P, Prencipe L. Serum triglycerides determined colorimetrically with an enzyme that produces hydrogen peroxide. *Clin Chem.* 1982; 28: 2077-2080.
171. Castelli WP; Levitas IM. New look at lipids: Why they're not all bad. *Curr Prescr.* 1977; 6: 39-43.
172. Friedewald T, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the Concentration of Low-Density Lipoprotein Cholesterol in Plasma, without Use of the Preparative Ultracentrifuge. 1972; 18: 499-502.
173. Villaroel LH, Zanolungo AB. Structural studies on the porphyrin from *Porphyra columbina* (Montagne). *Carbohydr Res.* 1981; 88: 139-145.
174. Kim JK, Kraemer GP, Yarish C. Physiological activity of *Porphyra* in relation to eulittoral zonation. *J Exp Mar Bio Ecol.* 2008; 365: 75-85.
175. Stengel DB, Connan S, Popper Z. Algal chemodiversity and bioactivity: sources of natural variability and implications for commercial application. *Biotechnol Adv.* 2011; 29: 483-501.
176. Tala F, Chow F. Phenology and photosynthetic performance of *Porphyra spp.* (Bangioophyceae, Rhodophyta): Seasonal and latitudinal variation in Chile. *Aquat Bot [Internet]. Elsevier B.V.;* 2014 [Acceso en 31 de mayo de 2014]; 113: 107–116. Disponible en: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S030437701300168X>.
177. Usov AI. Polysaccharides of the red algae. En: *Advances in Carbohydrate chemistry and Biochemistry.* 2011; 65: 127-155.
178. Climent MJ, García H. Ibarra S, Morera I. Técnicas espectroscópicas, espectroscopia IR. En: *Experimentación en química: Química Orgánica, Ingeniería Química.* Valencia: Univ. Politéc. 2005. P. 13-17.
179. Brash D. J., Chang H. M., Chuah C. T., Melton L. D. The galactan sulfate from the edible, red alga *Porphyra columbina*. *Carbohydr Res.* 1981; 97: 113–125.

180. Pereira L., Amado A. M., Critchley A. T., Van de Velde F., Ribeiro-Claro P. J. A. Identification of selected seaweed polysaccharides (phycocolloids) by vibrational spectroscopy (FTIR-ATR and FT-Raman). *Food Hydrocoll.* 2009; 23: 1903-1909.
181. Rondeau-Mouro C, Buléon A, Lahaye M. Caractérisation par RMN des biopolymères d'origine végétale, de la molécule à l'organisation supramoléculaire. *Comptes Rendus Chim.* 2008; 11: 370-379.
182. Knutsen SH., Grasdalen H. Characterization of water extractable polysaccharides from Norwegian *Furcellaria lumbricalis* (Huds.), Lamour. (Gigartinales, Rhodophyceae) by IR and NMR Spectroscopy. *Bot. Mar.* 1987; 30: 497-505.
183. Murano E, Toffanin R, Knutsen SH, Focher B, Rizzo R & Paoletti S. Evaluation of steam explosion as pretreatment in agar extraction from *Gracilaria dura* (C. Agardh) J. Agardh (Gracilariaceae, Rhodophyta). *Appl. Phycol.* 1993; 5: 417-424.
184. Murano E, Toffanin R, Cecere E, Rizzo R, Knutsen SH. Investigation of the carrageenans extracted from *Solieria filiformis* and *Agardhiella subulata* from Mar Piccolo, Taranto. *Mar. Chem.* 1997; 58: 319-325.
185. P.m.r. spectral assignments for O-methyl groups in mono-methylated D-hexoses. *Carbohydr. Res.* 1971; 16: 232-234.
186. Oliveira MN De, Freitas ALP, Carvalho AFU, Sampaio TMT, Farias DF, Alves Teixeira DI, et al. Nutritive and non-nutritive attributes of washed-up seaweeds from the coast of Ceará, Brazil. *Food Chem.* 2009; 115: 254-259.
187. Contreras-Porcia L, Thomas D, Flores V, Correa JA. Tolerance to oxidative stress induced by desiccation in *Porphyra columbina* (Bangiales, Rhodophyta). *J Exp Bot.* 2011; 62(6): 1815-1829.
188. Cian RE, Martínez-Augustín O, Drago SR. Bioactive properties of peptides obtained by enzymatic hydrolysis from protein byproducts of *Porphyra columbina*. *Food Res Int.* 2012; 49: 364-372.
189. Cian RE, Fajardo MA, Alaiz M, Vioque J, González RJ, Drago SR. Chemical composition, nutritional and antioxidant properties of the red edible seaweed *Porphyra columbina*. *Int J Food Sci Nutr.* 2013; 7486: 1-7.
190. Cascales M, Ferrándiz F. Situación actual en el tratamiento de las hepatopatías. En: Aspectos bioquímicos y farmacológicos en disfunciones hepáticas. Madrid: Imprenta Aguirre. 1985; p. 59-81.
191. Galiana A. Situación actual en el tratamiento farmacológico de las hepatopatías. En: Cáscales M, Fernández F. Aspectos bioquímicos y farmacológicos en disfunciones hepáticas. Madrid: Imprenta Aguirre. 1987; p. 61-70.
192. Manna P, Sinha M. Extracto acuoso de *Terminalia arjuna* impide que el tetracloruro de carbono induzca trastornos hepático y renales. *BMC Complement Altern Med.* 2006; 6: 33-39.
193. Manterola C, Pineda V. El valor de “p” y la “significación estadística”. Aspectos generales y su valor en la práctica clínica. *Rev. Chil Cir.* 2010; 60: 86-89.
194. Díaz J, Fernández del Barrio MT, Parede F. Enzimología Clínica. En: Aspectos básicos de bioquímica clínica. Madrid: Díaz de Santos S.A. 1997. P. 109-110.
195. Liu F, Gu J, Zhang L, Shen W, Guo T, Liu C, He P. Research Note *Ex vivo* antioxidation activity of polysaccharides from the red alga *Porphyra yezoensis*. *Cienc Mar.* 2008; 34: 253-261.

196. Vidal A, Fallarero A, Andrade-wartha ERS De, Mara A et al. Composición química y actividad antioxidante del alga marina roja *Bryothamnion triquetrum* (S.G.Gmelin) Howe. Braz J Popul Stud. 2006; 42(4): 589-560.
197. Pérez-Pérez EM, Rdríguez-Malaver AJ, Padilla N, Lapenna E, Medina-Ramírez G. Estudio de la capacidad antioxidante de extractos crudos de varias especies de algas venezolanas. Rev Fac Farm. 2009; 51(2): 3-10.
198. Melov S. Animal models of oxidative stress, aging, and therapeutic antioxidant interventions. Int J Biochem Cell Biol. 2002; 34(11): 1395-1400.
199. Otero-Raviña F, Grigorian-Shamagian L, Blanco R, Gómez JL, Fernández JM, González-Juanatey JR. Modificaciones en el perfil lipídico tras el consumo regular de conservas de pescado. Influencia de la adición de isoflavonas, ácidos grasos omega-3 y fitoesteroles. Med Clin (Barc). 2007; 129(3): 81-85.
200. Rodríguez-Roca GC, Rodríguez-Padial L, Alonso-Moreno FJ, Romero-Gutiérrez A, Akerström F, Villarín-Castro A, et al. Perfil lipídico en pacientes ingresados por síndrome coronario agudo en España: datos del área sanitaria de Toledo entre los años 2005 y 2008. Semergen. 2013, 39(6): 298-303.
201. Dullaet RPF, Tietge UJF, Kwakernaak AJ, Dikkeschei BD, Pertou F, Tio RA. Alterations in plasma lecithin: 126 cholesterol acyltransferase and myeloperoxidase in acute myocardial infarction: Implications for cardiac outcome. Atherosclerosis. 2014; 234: 185-192.
202. Hakimoglu F, Kizil G, Kanay Z, Kili M, Isi H. The effect to ethanol extract of *Hypericum lysimachioides* on lipid profile in hypercholesterolemic rabbits and its in vitro antioxidant activity. Atherosclerosis. 2007; 192: 113-122.
203. Arrington L, Kelley KC. Producción y biología de los Conejos Domésticos. Buenos Aires: Hemisferio Sur; 1984.
204. Lebas F, Coudert P, de Rochambeau H, Thébault RG. El conejo, cría y patología [monografías en internet]. Roma: FAO; 1996 [Acceso en 2 de mayo de 2014]. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/014/t1690s/t1690s.pdf>.
205. USPDI. Drug Information for the Health Care Professional. Vol 1. 25^a ed. Massachussets: World Bock Service. 2006.
206. Qian L, Zhou Y, Ma J. Hypolipidemic effect of the polysaccharides from *Porphyra yezoensis*. Int. J Biol. Macrom. 2014; 68: 48-49.
207. Slavin J. Health aspects of dietary fibre. En: Fibre-Rich and Wholegrain Foods. Oxford: Woodhead Publishing Limited. 2013. P. 61-75.
208. Hehemann JH, Correc G, Barbeyron T, Helbert W, Czejek M, Michel G. Transfer of Carbohydrate-active enzymes from marine bacteria to Japanese gut microbiota. Nature 2010; 464: 908-912.
209. Rajapakse N, Kim S. Nutritional and Digestive Health Benefits of Seaweed. Adv Food Nutr Res. 2011; 64: 17-28.
210. Rupérez P, Saura-Calixto F. Dietary fibre and physicochemical properties of edible Spanish seaweeds. 2001; 212: 349-354.

ANEXOS

ANEXO I. Tabla de Principales pigmentos, productos de almacenamiento y recubrimiento de células de la División algal⁸.

Phylum	Pigments (See Figures 3.5–3.9)					Storage Products
	Chlorophylls	Phycobilins	Main Carotenoids	Main Xanthophylls		
Cyanobacteria	<i>a, b</i>	C-phycoerythrin C-phycoeyanin Allophycocyanin	β -carotene	Myxoxanthin Zeaxanthin	Cyanophycin (arginine and aspartic acid) Cyanophyccean starch (α -1,4-glucan)	
Glaucophyta	<i>a</i>	Phycoerythrocyanin C-phycoeyanin	β -carotene	Zeaxanthin	Starch (α -1,4-glucan)	
Rhodophyta	<i>a</i>	Allophycocyanin B-phycoerythrin R-phycoerythrin R-phycoeyanin Allophycocyanin	α - and β -carotene	Lutein	Floridean starch (α -1,4-glucan)	
Chlorophyta	<i>a, b</i>	Absent	α -, β -, and γ -carotene	Lutein Prasinoxanthin	Starch (α -1,4-glucan)	
Charophyta	<i>a, b</i>	Absent	α -, β -, and γ -carotene	Lutein Prasinoxanthin	Starch (α -1,4-glucan)	
Haptophyta	<i>a, c_1, c_2</i>	Absent	α - and β -carotene	Fucoxanthin	Chrysolaminaran (β -1,3-glucan)	
Cryptophyta	<i>a, c_2</i>	B-phycoerythrin (545) R-phycoeyanin	α -, β -, and ϵ -carotene	Alloxanthin	Starch (α -1,4-glucan)	
Ochromyxa	<i>a, c_1, c_2, c_3</i>	Allophycocyanin	α -, β -, and ϵ -carotene	Fucoxanthin, violaxanthin	Chrysolaminaran (β -1,3-glucan)	
Cercozoa (Chlorarachniophyceae)	<i>a, b</i>	Absent	Absent	Lutein, neoxanthin, violaxanthin	Paramylon (β -1,3-glucan)	
Myxozoa (Dynophyceae)	<i>a, c_1, c_2</i>	Absent	β -carotene	Peridinin Fucoxanthin Diadinoxanthin	Starch (α -1,4-glucan)	
Eustenozoa (Euglenophyceae)	<i>a, b</i>	Absent	β - and γ -carotene	Dinoxanthin Gyroxanthin Diadinoxanthin	Paramylon (β -1,3-glucan)	

Anexo II. Certificación Botánica de *Porphyra columbina*.

MARIO J. BENAVENTE PALACIOS
Biólogo – Botánico
C.B.P. N° 2716

CERTIFICACIÓN BOTÁNICA

Se certifica que la muestra vegetal del alga “COCHAYUYO” proporcionada por la Señorita Blanca Yessenia, AGUILAR VELASQUEZ, alumna de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la UNMSM, ha sido estudiada, identificada y clasificada como *Porphyra columbina* Montagne y según el sistema de clasificación de Guiry, M.D. & Guiry, G.M. *Algae Base* (2013), y se ubica en las siguientes categorías taxonómicas como sigue:

DIVISIÓN	RHODOPHYTA
CLASE	BANGIOPHYCEAE
SUBCLASE	BANGIOPHYCIDAE
ORDEN	BANGIALES
FAMILIA	BANGIACEAE
GENERO	<i>Porphyra</i>
ESPECIE	<i>Porphyra columbina</i> Montagne

NOMBRE VULGAR O COMUN: “COCHAYUYO”

DETERMINADO POR: **Mario J. Benavente Palacios**

Se expide la presente certificación Botánica a solicitud de la persona interesada para los fines que estimen conveniente.

Lima, 17 de Julio de 2013



.....
Mario J. Benavente Palacios
Biólogo - Botánico
C.B.P. N° 2716
R.D. N° 0420-2011-AG-DGFFS-DGEFFS
3 AGOSTO 2011

Anexo III. Cálculo de la cantidad de sesos de res cocido a emplear en dieta hiperlipídica.

Considerándose un incremento del 15% de calorías a la ración normal para generar hiperlipemia y aumento de peso:

Se sabe, según lo declarado en el empaque de conejina R que tiene 2,5 Mcal/kg entonces en 100 gramos tendrá 250 kcal.

El 15% de 250 es 37,5. Se requieren 37,5 kcal adicionales para generar hiperlipemia y obesidad.

Los sesos de res cocido en 100 gramos tienen 151 kcal, por lo cual en 1 gramo se tendrá 1.51 kcal. En tanto el aceite de maíz, empleado como vehículo, tiene 884 kcal en 100 gramos por lo cual en 1 gramo tendrá 8.84 kcal.

Después de la realización de pilotos para obtener una emulsión homogénea, se consideró la proporción 1:1 sesos de res cocido-aceite de maíz la idónea para tal fin.

Con lo cual en 1 g de sesos de res + 1 g de aceite de maíz hay 10.35 kcal.

Si se divide 37.5 entre 10.35 se tendrá que se requieren 3.6232 gramos de cada componente para tener 15% de calorías de la ración normal en dieta hiperlipídica. Redondeando a dos decimales se tiene 3,63 gramos, con el fin de que la dieta hiperlipídica no represente menos del 15% ya que se establece que dietas hipercalóricas de 15 a 20% suben de peso. Después de multiplicar 3,63 por la cantidad de animales a administrar, el peso de la emulsión resultante se dividió en igual número de dichos animales y se administró en jeringas.

La cantidad de colesterol administrado a cada animal fue de 112.52 mg.

Haciendo las correcciones pertinentes, el aumento de calorías fue de 15.03% después del redondeo de los gramos de sesos de res cocido y aceite de maíz a emplear.

Anexo IV. Programa de administración diario por grupo experimental de conejo.

Hora del día	Actividad	Grupos experimentales			
		GC (Grupo control normal)	GH (Grupo control de lipemia)	GG (Grupo gemfibrozilo)	GP (Grupo polisacárido)
8:00 - 10:00	Limpieza de micro y macroambiente	X	X	X	X
10:00 - 10:30	Toma y registro de peso corporal	X	X	X	X
10:30 - 12:00	Toma de muestra de sangre	X	X	X	X
12:00 - 12:30	Preparación de sustancias a administrar		X	X	
12:30 - 13:00	Administración de gemfibrozilo			X	
13:00 - 13:20	Dieta normal: 40 g conejina R y agua	X	X	X	X
13:30 - 15:00	Administración de dieta hiperlipídica		X ³	X ¹	X ²
15:00 - 15:30	Administración de agua destilada	X			
16:00 - 16:30	Preparación de sustancias a administrar				X
17:30 - 18:00	Administración de porfirano				X
19:00 - 19:30	Dieta normal: 60 g conejina R y agua	X	X	X	X

^{1, 2, 3} es el orden en que se administran los grupos con dieta hiperlipídica.

La ración de alimento diaria es dividida en dos, 40% y 60%, siguiendo la guía del INS así como se observó durante los días de adaptación al ambiente de estudio que de dárseles la ración completa de 100 gramos una vez al día, había desperdicio puesto que el animal en su naturaleza coloca su pata dentro del recipiente que contiene el alimento mientras se alimenta y si se encuentra saciado por movimientos bruscos puede llegar a botar el alimento sobrante o defecar sobre este y en algún momento posterior alimentarse del alimento contaminado. Por lo cual se consideró apropiada la división.

Anexo V. Ilustración de procesos y pruebas experimentales realizadas.



Figura N° 46. Separación de polisacárido.



Figura N° 47. Polisacárido liofilizado. Se conservó en frasco de vidrio y en frío.



Figura N° 48. Ratones marcados. Toxicidad aguda oral.



Figura N° 49. Coloración de Formazan rojo.



Figura N° 50. Coloración rosada. Prueba de MDA.



Figura N° 51. Administración de polisacárido por vía oral (conejo).

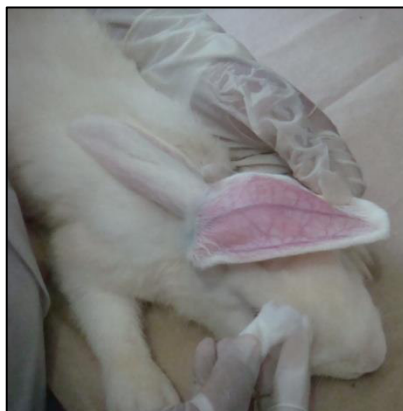


Figura N° 52. Vena marginal del conejo.



Figura N° 53. Separación de suero en tubo vacutainer.



Figura N° 54. Calibración de la prueba de colesterol.

GLOSARIO

Compuestos bioactivos: moléculas presentes en productos de origen vegetal o animal que actúan en el metabolismo humano y ejercen efectos benéficos para la salud.

Dislipidemias: son un conjunto de enfermedades asintomáticas, que tienen en común que son causadas por concentraciones anormales de lipoproteínas sanguíneas.

Glaucophyta: división de algas unicelulares de agua dulce. Se les agrupa en el reino plantae.

Asociación simbiótica: es la asociación de individuos animales o vegetales de diferentes especies, en la que ambos simbioses sacan provecho de la vida en común.

Cianobacteria: filo de dominio Bacteria, comprende las bacterias capaces de realizar fotosíntesis oxigénica. Son las únicas procariotas que llevan a cabo ese tipo de fotosíntesis.

Plástidos: orgánulos celulares eucarióticos, propios de las plantas y algas. Se encuentran limitados del citoplasma por una doble membrana. Intervienen en la fotosíntesis y en la síntesis y almacenamiento de carbohidratos, lípidos y proteínas.

Filamentosa: cuerpo en forma de hilo, flexible o rígido.

Infraespecífico: dicho de un taxón, que es de categoría inferior a la especie.

Formación de Doushantuo: es un Lagerstätte (yacimiento) descubierto en 1997 en la provincia de Guizhou, al sur de China, y está caracterizado por ser uno de los yacimientos de fósiles más antiguos y mejor preservados de China.

Genoma: conjunto de cromosomas de una célula.

Mitogenoma: genoma mitocondrial.

Roseta: disposición circular de hojas en las que todas se encuentran a la misma altura.

Cordada: en forma de corazón.

Coriáceo: de consistencia similar al cuero.

Iridiscente: que muestra o refleja los colores del arcoíris.

Pirenoide: masa fundamentalmente de proteína incluida en los plastos de las algas.

Lipina: la familia lipina, está compuesta por tres miembros, lipina-1, lipina-2 y lipina-3. Todas ellas son fosfatasa de ácido fosfatídico, estas enzimas son claves en el metabolismo lipídico.

Dieta: alimentación habitual de una persona.

Cultura: conjunto de modos de vida y costumbres de una época o grupo social.

Autocatalítica: en reacciones químicas, se trata de una reacción en la que por lo menos un producto actúa como catalizador.

Quelar: formar un enlace, como un complejo en anillo con iones de metales pesados.

Cofactor: componente no proteico, termoestable y de baja masa molecular, necesario para la acción de una enzima.

Cosustrato: algunas veces se denomina así a las coenzimas, estas coenzimas son sustratos de las enzimas y no forman parte permanente de la estructura enzimática.

Metaloenzima: enzima que precisa de ion metálico para reacción con sustrato.

Isoforma: es una de las distintas formas de la misma proteína. En el caso de enzimas, las isoformas son comúnmente llamadas isoenzimas.

Cazadores estequiométricos: moléculas capaces de neutralizar radicales libres en una proporción definida.

Carotenoide: pigmento orgánico del grupo de isoprenoide que se encuentra en forma natural en plantas y otros organismos fotosintéticos como las algas.

Mimético: relativo a la mimesis. La mimesis es la imitación del habla, gesto, comportamiento de algo o alguien.

Murino: animal de la subfamilia de roedores miomorfos Murinae, incluye a los ratones y ratas. Los miomorfos son un suborden de mamíferos roedores.

Testigo: en estudios de investigación se refiere al grupo también denominado control que es aquel que no se trata con el elemento en investigación, problema, y está bajo las mismas condiciones de experimentación.

Catabolismo: es la transformación de biomoléculas complejas en moléculas sencillas y en el almacenamiento adecuado de la energía química desprendida en forma de enlaces de alta energía en moléculas de adenosín trifosfato.

Anabolismo: es la síntesis de componentes celulares a partir de precursores de baja masa molecular, por lo que recibe también el nombre de biosíntesis.

Alifático: compuesto orgánico que es tanto cíclico como alifático. Los alifáticos son compuestos de carbono e hidrógeno no aromático.

Síntesis de novo: inicia con la síntesis de purinas, se utiliza generalmente en el metabolismo de algunos lípidos como ácidos grasos y triacilglicerol.

Mitógeno: factores que actúan en el ciclo celular estimulando la división celular. Pueden estimular la proliferación de muchos tipos celulares como los factores de crecimiento derivados de las plaquetas o ser específicos como en la eritropoyetina.

Insuficiencia ponderal: término que se refiere a estar por debajo del peso que se considera saludable.

Sistema de valores: son los valores que se toman basados en un conjunto particular (personal o general) de creencias, formas de vida. Un valor se entiende como conceptos que se pueden poner en práctica en la vida diaria para vivir mejor.

Fitofármacos: medicamentos que contienen como principio activo exclusivamente plantas, partes de plantas, ingredientes vegetales o bien, preparaciones obtenidas a partir de ellas.

Enterocito: células epiteliales del intestino encargadas de absorber diversas moléculas alimenticias y transportarlas al interior del organismo.

Índice de masa corporal: medida de asociación entre el peso y la talla de un individuo.